Die Spezifität bakterieller Ribonucleotidreduktasen für Substrat- und Effektornucleotide

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

WALTER LUDWIG

aus Kassel

Marburg/Lahn 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546010_0040

Die Spezifität bakterieller Ribonucleotidreduktasen für Substrat- und Effektornucleotide

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

WALTER LUDWIG

aus Kassel

Marburg/Lahn 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

Vom Fachbereich Chemie der Philipps Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 30. 1. 1978

Tag der mündlichen Prüfung 8. 2. 1978

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann
Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Schneider

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

		Seite
1.	Einleitung	
1.1.	DNA-Synthese und Ribonucleotidreduktion	1
1.2.	Ribonucleosidtriphosphat-Reduktase (EC 1.17.4.2.) aus Lactobacillus leichmannii	4
1.3.	Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase (EC 1.17.4.1.) aus Escherichia coli	8
1.4.	Aufgabenstellung dieser Arbeit	10
2.	Ergebnisse	
2.1.	Reinigung der Ribonucleotidreduktase aus E. coli	13
2.2.	Reinigung des Thioredoxin-Systems aus E. coli	18
2.3.	Nucleotidsynthesen	19
2.4.	Spezifität der Ribonucleosidtriphosphat-Reduktase aus Lactobacillus leichmannii	22
2.4.1.	Modifizierte Ribonucleosidtriphosphate	22
2.4.2.	In der Base modifizierte Desoxyribonucleotide als Aktivatoren	25
2.4.3.	Wirkung von Arabinonucleosidtriphosphaten	27
2.4.4.	Aktivität von modifizierten Nucleotiden im Tritiumaustausch	31
2.5.	Spezifität der Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase aus Escherichia coli	33
2.5.1.	Bedingungen der Enzymkinetik	33
2.5.2.	Nucleosiddiphosphate als Substrate der E. coli-Ribonucleotidreduktase	36
2.5.2.1.	Basenmodifizierte Nucleotide mit Substrateigenschaften	36
2.5.2.2.	Modifizierte Nucleotide mit geringer oder ohne Substrateigenschaft	41
2.5.2.3.	Verhalten von Arabinonucleosiddiphosphaten	45

Seite

2.5.3. Wirkung von Desoxyribonucleosidtriphosphaten auf die Substratspezifität der E. coli-Ribonucleotidreduktase 47
2.5.4. Einfluß von Nucleosidtriphosphaten auf die Substratreduktion der E. coli-Ribonucleotidreduktase 50

3. Diskussion
3.1. Modellvorstellungen zur Beschreibung alloster geregelter Enzyme 54
3.2. Spezifität der Lactobacillus leichmannii-Ribonucleotidreduktase für Nucleotide 57
3.2.1. Substrat-Spezifität 57
3.2.2. Wirkung von allosteren Aktivatoren 60
3.3. Eigenschaften der Escherichia coli-Ribonucleotidreduktase 63
3.3.1. Substrat-Spezifität 63
3.3.2. Beziehungen zwischen Substrat und Aktivator 67
3.4. Bedeutung der Molekülkonformation 70
3.5. Vergleich der Eigenschaften der bakteriellen Ribonucleotidreduktasen 73
3.5.1. Gemeinsamkeiten beider Enzyme 73
3.5.2. Nucleotidspezifitäten der Ribonucleotidreduktasen 75
3.5.2.1. Physiologische Bedeutung 75
3.5.2.2. Mechanismus der Substrat-Aktivator-Erkennung 77
3.5.2.3. Artspezifische Unterschiede der Enzyme 81
3.6. Einfluß von Arabinonucleotiden auf die bakteriellen Ribonucleotidreduktasen 82

4. Experimenteller Teil
4.1. Enzymreinigungen 88
4.1.1. Reinigung der Ribonucleotidreduktase aus E. coli 88
4.1.2. Reinigung des Thioredoxin-Systems 91
4.1.2.1. Thioredoxin-Reduktase 91

Seite

4.1.2.2. Thioredoxin 92
4.2. Enzymtests 93
4.2.1. Ribonucleosidtriphosphat-Reduktase aus Lactobacillus leichmannii 93
4.2.2. Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase aus Escherichia coli 95
4.2.3. Aktivitätsbestimmung von Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase 98
4.3. Phosphorylierung von Nucleosiden und Nucleotiden 99
4.3.1. Nucleosidmonophosphate 99
4.3.2. Nucleosid-di- und triphosphate 99
4.4. Darstellung von modifizierten Nucleosiden und Nucleotiden 101
4.4.1. 8-Bromadenosinnucleotide 101
4.4.2. 2'-Desoxyxanthosin-5'-monophosphat 101
4.4.3. 2,6-Diaminopurinribosid = 2-Aminoadenosin 102
4.4.4. 2-Aminopurinribosid 102
4.4.5. N^6-(p-Fluorbenzoyl-)adenosinmonophosphat 103
4.5. Allgemeine Methoden und physikalische Daten der Nucleotide 104

5. Zusammenfassung 106

6. Literaturverzeichnis 109

Abkürzungen

Nucleotide:	5'-Mono-, -Di-, -Triphosphat von
AMP, ADP, ATP	Adenosin
a^2AMP, a^2ADP, a^2ATP	2-Aminoadenosin
a^2PuMP, a^2PuDP, a^2PuTP	2-Aminopurinribosid
araAMP, araADP, araATP	Arabinoadenosin
araCMP, araCDP, araCTP	Arabinocytidin
br^8AMP, br^8ADP, br^8ATP	8-Bromadenosin
br^8dAMP, br^8dADP, br^8dATP	8-Bromdesoxyadenosin
br^5dUMP, br^5dUDP, br^5dUTP	5-Bromdesoxyuridin
BzMP, BzDP, BzTP	Benzimidazolribosid
CMP, CDP, CTP	Cytidin
dAMP, dADP, dATP	Desoxyadenosin
dCMP, dCDP, dCTP	Desoxycytidin
dGMP, dGDP, dGTP	Desoxyguanosin
dIMP, dIDP, dITP	Desoxyinosin
dNMP, dNDP, dNTP	Desoxyribonucleosid
dTMP, dTDP, dTTP	Desoxythymidin
dUMP, dUDP, dUTP	Desoxyuridin
dXMP, dXDP, dXTP	Desoxyxanthosin
m_2^6AMP, m_2^6ADP, m_2^6ATP	N^6-Dimethyladenosin
fbzAMP, fbzADP, fbzATP	N^6-(p-Fluorbenzoyl-)adenosin
GMP, GDP, GTP	Guanosin
IMP, IDP, ITP	Inosin
NMP, NDP, NTP	Ribonucleosid
PuMP, PuDP, PuTP	Purinribosid
s^6PuMP, s^6PuDP, s^6PuTP	6-Thiopurinribosid
UMP, UDP, UTP	Uridin
XMP, XDP, XTP	Xanthosin
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduziert

ADP-Sepharose	2',5'-Adenosindiphosphat-Sepharose
Ci	Curie = 2.22×10^{12} dpm
DEAE-Cellulose	Diäthylaminoäthyl-Cellulose
Dowex 50	Kationenaustauscher
Dowex 1 x 2, 2 x 8	Anionenaustauscher
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreit
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
HEPES	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-2'-äthansulfonsäure
OD_{578}	Optische Dichte bei 578 nm
PEI-Cellulose	Polyäthylenimin-Cellulose
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
nkat	nMole Umsatz von Substrat/ Minute

1. Einleitung

1.1. DNA-Synthese und Ribonucleotidreduktion

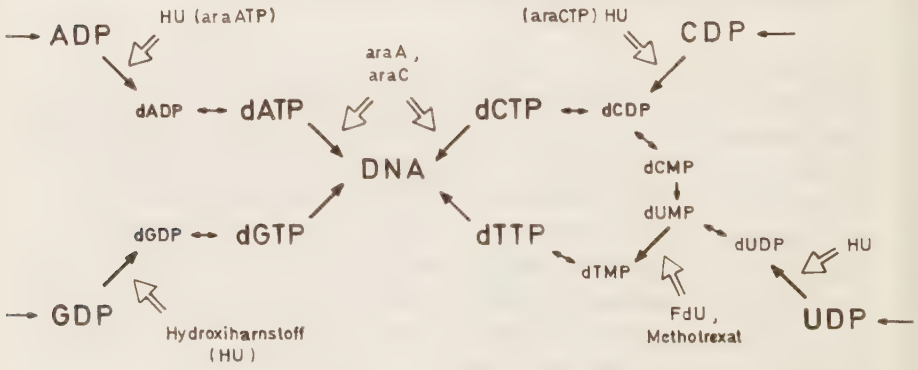
Will man als Naturwissenschaftler " Leben " definieren, stößt man auf zwei Charakteristika: Einmal muß ein Lebewesen in der Lage sein, in einem Stoffwechsel lebensnotwendige Stoffe aufzubauen und sich mit Energie zu versorgen, andererseits muß es zur Ermöglichung und Steuerung der Soffwechselprozesse und zur Erhaltung seiner Spezies eine Erbinformation besitzen und weitergeben können. Diese Information liegt in der Zelle in Form des Makromoleküls Desoxyribonucleinsäure (DNA) vor. Von F. Miescher 1869 entdeckt, dauerte es bis zu den Versuchen von Avery et al. in 1944, die die Lokalisation der genetischen Information auf dem DNA-Molekül bewiesen. Aber erst die Arbeiten von Watson und Crick (1952) gaben ein Verständnis für die Codierung und Weitergabe der genetischen Information auch auf molekularer Basis. Heute ist man auf dem Gebiet soweit fortgeschritten, daß man in Bakterien fremde Erbinformationen einschleusen kann. Diese hochentwickelte Technik, die als " Genmanipulation " bekannt geworden ist, sollte aber nicht darüber hinwegtäuschen, daß unserem Wissen um die DNA noch wichtige Einzelheiten und Strukturen fehlen. Vor allem die Steuerung von Stoffwechselprozessen und die Zelldifferenzierung versteht man wenig, sodaß eine molekularbiologische Beschreibung des " Lebens " auch heute noch nicht möglich ist.

Sehr lückenhaft bleiben unter diesen Prozessen die Stoffwechselwege, die die Bausteine der Desoxyribonucleinsäure, die vier Desoxyribonucleotide bereitstellen. Für die Biosynthese eines aus einer heterocyclischen Base, einem Molekül Desoxyribose und einer Phosphatgruppe bestehenden Desoxyribonucleotids sind zwei Wege denkbar: Die Verknüpfung einer der vier Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin mit Desoxyribosephosphat (analog Ribosephosphat), oder aber eine Reduktion der in der Zelle synthetisierten Ribonucleotide zu den 2'-Desoxyribonucleotiden. Der erste Weg (" salvage pathway ") wird

bei einigen auxotrophen Mikroorganismen und z.T. in Tumorgeweben beschritten. Universeller ist jedoch die direkte Reduktion von Ribonucleotiden, was durch den Nachweis des diese Reaktion katalysierenden Enzyms Ribonucleotidreduktase in Prokaryonten, niederen Eukaryonten, Pflanzen und Tieren als gesichert gelten kann.[1,2].

Die Kopplung der Desoxynucleotidsynthese mit dem Ribonucleotidstoffwechsel bringt der Zelle ökonomische Vorteile, da eine Synthese der Desoxyribonucleotide aus einzelnen Teilstücken umgangen wird; andererseits muß die Zelle jederzeit über genügend Desoxy- bzw. Ribonucleotide verfügen können. Für diese Zwecke existieren in den Stoffwechselwegen zahlreiche alloster geregelte Enzyme wie die Aspartat-Transcarbamylase aus E. coli [3], bei denen im klassischen Fall die " feed-back "-Hemmung dafür sorgt, daß ein am Anfang einer Reaktionsfolge liegendes Enzym durch sich anhäufende Endprodukte " abgeschaltet " wird. Eine solche Schlüsselstellung besitzen alle bekannten Ribonucleotidreduktasen (nicht aber beispielsweise Thymidylatsynthetase als das vielleicht am besten bekannte Enzym der DNA-Vorläufersynthese), da sie durch Reaktionsprodukte komplex alloster geregelt werden.

Abbildung 1
Desoxyribonucleotid-Stoffwechsel und einige wichtige Inhibitoren

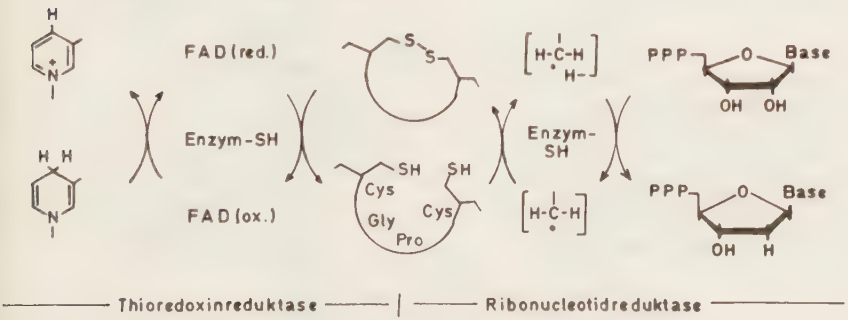


NDP ➧ dNDP: Ribonucleotidreduktase, dNTP ➧ DNA: DNA-Polymerase
dUMP ➧ dTMP: Thymidylatsynthetase

Die besondere Stellung der Ribonucleotidreduktasen zeigt sich am deutlichsten in ihrer Abhängigkeit vom Zellzyklus. In synchronen Kulturen der Hefe [4] oder der Grünalge Scenedesmus obliquus fällt das Maximum der Enzymaktivität mit dem Maximum der DNA-Synthese in der S-Phase zusammen [5]. Daraus wird verständlich, daß eine Ribonucleotidreduktase-Aktivität nur in embryonalen Gewebe (Weizen- [6] oder Bohnenkeimlinge [7]) oder anderen stark teilungsaktiven Geweben (Novikoff-Ascites-Tumorzellen [8], regenerierende Rattenleber [9], Knochenmarkszellen [10]) nachzuweisen und teilweise zu reinigen war. Zusätzlich wird der Nachweis der Ribonucleotidreduktasen durch in vivo vorhandene Inhibitoren erschwert, wie sie bei den Enzymen aus Hefe [11], dem Schleimpilz Achlya [12] oder Weizenembryonen [6,13] gefunden werden konnte. Einfacher stellt sich die Situation in Bakterienzellen dar, in denen die Ribonucleotidreduktase-Aktivität während der logarithmischen Wachstumsphase am ausgeprägtesten ist. Die bisher zur Homogenität gereinigten Ribonucleotidreduktasen stammen daher aus Bakterien bzw. Phagen-infizierten Bakterien [14].

Charakteristisch für alle Ribonucleotidreduktasen ist ihre Abhängigkeit von reduzierten Dithiolen. In vivo übernimmt ein kleines hitzestabiles Protein, das Thioredoxin mit einer exponierten Dithiol-Gruppierung diese Aufgabe, das nach Oxidation zum Disulfid durch die NADPH-abhängige Thioredoxin-Reduktase wieder reduziert wird (Abb. 2) .

Abbildung 2
Herkunft und Weg des Wasserstoffs



Obwohl Thioredoxine für nahezu alle gereinigten Ribonucleotidreduktasen beschrieben wurden [1,2], ist es möglich, daß in vivo noch andere Thiole mit Ribonucleotidreduktase reagieren können. Ein auf Glutathion basierendes System ist kürzlich beschrieben worden, das noch schneller als das Thioredoxin-System den Wasserstoff auf Ribonucleotidreduktase überträgt [15].

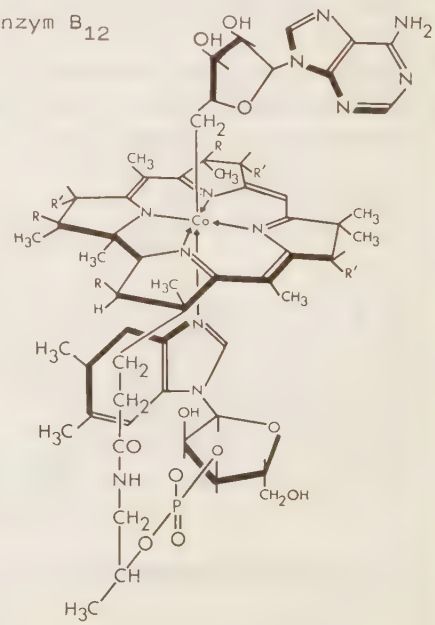
Die Ribonucleotidreduktasen aus Escherichia coli und Lactobacillus leichmannii nehmen nicht nur als bis zur Homogenität gereinigte Proteine eine Sonderstellung ein, sondern sie können auch als charakteristische Vertreter aller anderen bisher bekannten Ribonucleotidreduktasen dienen. Aus diesem Grunde wurden sie für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen der Substrat- und Effektorspezifität der Ribonucleotidreduktion ausgewählt und sollen hier näher vorgestellt werden.

1.2. Ribonucleosidtriphosphat-Reduktase (EC 1.17.4.2.) aus Lactobacillus leichmannii

Das aus der Gruppe der Coenzym B_{12}-abhängigen Ribonucleotidreduktasen bis zur Homogenität gereinigte Enzym aus L. leichmannii [16,17] setzt alle vier natürlichen Ribonucleosidtriphosphate um. Neben dem absoluten Bedürfnis für Desoxyadenosylcobalamin (Coenzym B_{12}) werden in vitro auch unphysiologische Dithiole wie reduzierte Liponsäure oder Dithiothreit (DTT) als Reduktionsmittel akzeptiert. Das Enzym besteht aus nur einer Polypeptidkette vom

Abbildung 3

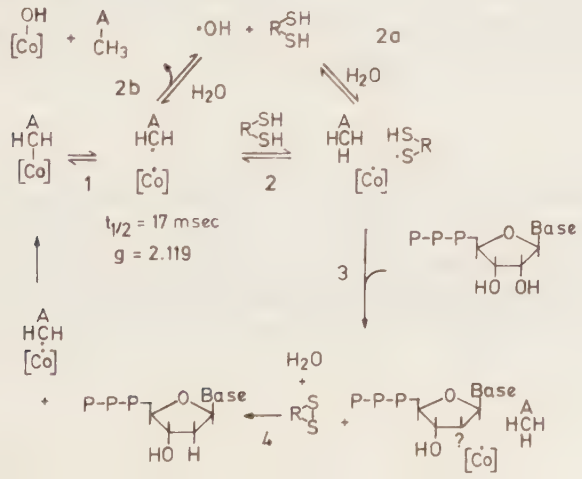
Coenzym B_{12}



Molekulargewicht 76 000 [14] und zeigt eine für die Ribonucleotidreduktasen typische, komplexe allostere Aktivierung durch die Reaktionsprodukte, die Desoxyribonucleosidtriphosphate [18]. Das Enzymprotein besitzt Bindungsstellen für Dithiole (Thioredoxin oder Dithiothreit), Coenzym B_{12}, Aktivatornucleotide und Substrat, wobei eine in dieser Reihe geordnete aufeinanderfolgende Bindung der Reaktionspartner notwendig zu sein scheint [19]. In Gleichgewichtsdialyse-Experimenten des bis auf Coenzym B_{12} kompletten Systems war eine Substratbindung an das Enzym nicht nachzuweisen [20].

Da die Bindungszentren für alle Reaktionspartner erst durch deren sukzessive Anlagerung entstehen, wird verständlich, daß eine Aufklärung des Reduktionsmechanismus auf erhebliche Schwierigkeiten stößt. Wie aus Isotopenmarkierungen hervorgeht, ist an der Reduktion nur die 2'-Hydroxylgruppe des Ribonucleotids direkt beteiligt [21]. Weitere Einsichten in den Reaktionsmechanismus erbrachten ESR-Spektren mit Hilfe der stopped-flow-Technik, die einen Radikalmechanismus unter Beteiligung des Coenzym B_{12} belegen [23,24]. Die Lokalisation eines Radikals der Lebensdauer $t_{1/2}$ = 17 msec und seine asymmetrische Umgebung sind erst kürzlich beschrieben worden [25]. Folgender Mechanismus faßt die Beobachtungen zusammen:

Abbildung 4
Mechanismus der Ribonucleotidreduktion in L. leichmannii

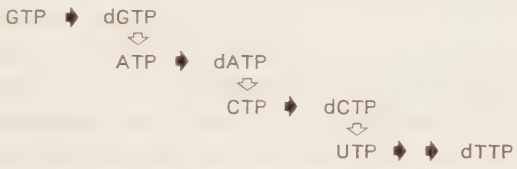


Die Schritte 1 bis 2b beschreiben eine besondere Eigenschaft der Coenzym B_{12}-abhängigen Ribonucleotidreduktasen, der man sich als Enzymtest bedient. In einem schnellen, der Reduktion vorgelagerten Gleichgewicht wird eine Tritium-Markierung der 5'-Methylengruppe des Desoxyadenosylteils von Coenzym B_{12} über eine Serie von Wasserstoffverschiebungen an das Wasser abgegeben. Eine Substratreduktion ist für diesen Austausch keine Bedingung, da Desoxyribonucleotide allein den Tritiumaustausch katalysieren [26]. Um den sich anschließenden geschwindigkeitsbestimmenden Schritt besteht noch größere Unsicherheit, da die entscheidende Zwischenstufe, ein 2'-Desoxyribonucleotid-Radikal, bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Eine endgültige Interpretation des am Enzym ablaufenden Reduktionsmechanismus können Daten über die Enzymstruktur geben, nur ist über die an Bindung und Katalyse beteiligten Aminosäurereste des sehr großen Proteins (ca. 690 Aminosäuren) bisher so gut wie nichts bekannt. Lediglich eine SH- (Cystein-) Gruppe im katalytischen Zentrum ist durch mehrere indirekte Befunde belegt [27]. In dieser für komplexe Enzyme nicht ungewöhnlichen Situation liegt ein alternativer, experimenteller Ansatz in gezielten Strukturmodifikationen von Coenzym und beteiligten Nucleotiden. Für das Coenzym sind eine große Anzahl von modifizierten Analogen synthetisiert und in ihrer Wirkung auf das Enzym getestet worden [27,28]. Dabei zeigte sich eine geringe Toleranz der Ribonucleotidreduktase gegenüber Änderungen im Corrin-Grundgerüst und eine extrem hohe Spezifität für den 5'-Desoxyadenosylrest; keines der synthetisierten Analogen konnte ohne großen oder gänzlichen Reaktivitätsverlust das Coenzym B_{12} ersetzen.

Die Situation an den Nucleotid-bindenden Zentren des Enzyms wird dadurch kompliziert, daß das Enzym vier natürliche Substrate besitzt. Unter in vitro-Bedingungen werden die vier Ribonucleosid-5'-triphosphate nicht gleich schnell umgesetzt, sondern die Reduktionsgeschwindigkeit fällt in der Reihe: GTP > CTP > ATP > UTP [18]. In vivo wird aber eine Regulation der

Enzymaktivität durch alloster wirkende Desoxyribonucleosidtriphosphate vorliegen, deren Einflüsse in vitro untersucht worden sind. Man findet eine allostere Aktivierung des Umsatzes in der Reihe: GTP = GTP+dATP = ATP+dGTP = CTP+dATP >UTP+dCTP [18]. Aus diesen Daten läßt sich eine physiologisch sinnvolle Abfolge der Ribonucleotidreduktion ableiten, die in einem kaskadenartigen Aktivierungsmechanismus die Zelle gleichmäßig mit allen vier Desoxyribonucleotiden versorgt:



Auch für die Nucleotid-bindenden Zentren ist versucht worden, durch Einsatz von Nucleotidanalogen die Strukturansprüche des Enzyms einzugrenzen. Dabei stellten sich die Triphosphatgruppierung [29] und die D-Ribofuranose-Struktur des Zuckers als essentiell heraus [19]. Nicht so ausgeprägt ist diese Spezifität für die allosteren Nucleotidbindungszentren, wo neben der Desoxyribofuranose- und Ribofuranose-Struktur des Zuckers auch 2'- oder 3'-O-Methylribonucleotide als Aktivatoren akzeptiert werden. Arabinofuranose-Derivate werden hier ebenfalls gebunden, jedoch unter Verlangsamung der Reaktion [19]. Ein Zusammenhang mit der cytostatischen Wirksamkeit von Arabinonucleotiden in vivo scheint vorhanden zu sein [30]. Zusätzlich beeinflussen diese Nucleotidanalogen den Tritiumaustausch und die Ribonucleotidreduktion unterschiedlich, woraus auf zwei allostere Bindungszentren geschlossen wurde [19,26].

Ändert man in Nucleosidtriphosphaten dagegen die Basenstruktur, reduzieren sich zwar die Reduktionsgeschwindigkeiten und die Aktivatoreigenschaften, aber die Funktion als Substrate der Ribonucleotidreduktase bleibt weitgehend erhalten. Dies wurde für die Triphosphate der Nucleosidantibiotika Tubercidin, Toyocamycin und Sangivamycin nachgewiesen [31]. Sogar eine

so unphysiologische Substanz wie das Benzimidazolribosid-5'-triphosphat wird sehr langsam, aber durchaus nachweisbar reduziert [19]. Die Basenstruktur erscheint demnach nicht essentiell für die Fähigkeit eines Ribonucleotids, Substrat für die Ribonucleotidreduktase aus L. leichmannii zu sein.

1.3. Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase (EC 1.17.4.1.) aus Escherichia coli

Die Ribonucleotidreduktase aus E. coli ist wohl bisher am genauesten untersucht worden, obwohl das Enzym komplizierter aufgebaut ist. Es steht seit kurzem auf einem spezialisierten λ-Phagen (auf E. coli) in reichlicher Menge zur Verfügung [32], sodaß sogar an eine röntgenographische Strukturaufklärung gedacht werden kann. Die bis zur Homogenität gereinigte Ribonucleotidreduktase setzt sich aus zwei Untereinheiten B_1 und B_2 mit den Molekulargewichten 160 000 bzw. 78 000 zusammen, die während der Reinigung getrennt werden [33]. In Magnesiumionen-Anwesenheit können sie zum funktionsfähigen Enzym wieder zusammentreten; die Untereinheiten allein besitzen keine Ribonucleotidreduktase-Aktivität. Beide Untereinheiten bestehen wiederum aus zwei Polypeptidketten. Bei der B_2-Untereinheit handelt es sich um zwei gleiche Polypeptide, womit der Untereinheit eine Substruktur des Typs β_2 zukommt. Davon unterschiedlich baut sich die B_1-Untereinheit aus zwei verwandten aber nicht identischen Teilstücken auf, was einem Strukturtyp $\alpha\alpha'$ entspricht. Die B_1-Untereinheit ist sauerstoffempfindlich, da essentielle Cystein-Reste oxidiert werden [34].

Wie die Ribonucleotidreduktase aus L. leichmannii setzt das E. coli Enzym alle vier Ribonucleotide um und kann in vitro Dithiole wie Dithiothreit als Reduktionsmittel akzeptieren; sie benötigt darüberhinaus keine weiteren Reaktionspartner. Als grundlegend wichtig für die Reaktion bildet die zwei Atome nicht-Häm-Eisen enthaltende B_2-Untereinheit ein Radikal aus, das an einer benzylständigen Methylengruppe eines Tyrosinrestes

jüngst lokalisiert worden ist [35,36]. Mit Hilfe von 2'-modifizierten Ribonucleosiddiphosphaten konnte belegt werden, daß essentielle Enzym-SH-Gruppen und das Radikal beim aktiven Enzym in nächster Nachbarschaft zu der zu reduzierenden 2'-Hydroxylgruppe liegen [37].

Ein unterschiedliches Verhalten der beiden Untereinheiten tritt weiterhin bei der funktionellen Zuordung gegenüber Nucleotiden und Reduktionsmittel zu Tage. Wie erwähnt muß die B_1-Untereinheit zur Aktivität im reduzierten Zustand vorliegen. Das scheint auch die Aufgabe des Thioredoxins in vivo zu sein, denn es ist nicht (wie bei der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase [38]) an dem eigentlichen Reduktionsprozeß beteiligt. In einem von der Ribonucleotidreduktion unabhängigen Prozeß reduziert es lediglich oxidierte Cystein-Aminosäureseitenreste der B_1-Untereinheit [39]. Ebenso unterschiedlich ist das Verhalten gegenüber Nucleotiden. Die E. coli-Ribonucleotidreduktase wird durch Nucleotide, speziell Desoxyribonucleosidtriphosphate alloster reguliert. Im Gegensatz zur L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase wird die Reduktion der Pyrimidinnucleotide bevorzugt durch ATP aktiviert, während dTTP die Reduktion von Purinnucleotiden stimuliert [40]. Anhäufung von dATP führt zu einer generellen Inaktivierung des Enzyms durch Oligomerisierung des Proteins [41]. Diese Nucleotid-gesteuerten Prozesse werden nur von der B_1-Untereinheit vermittelt, denn sie besitzt alle Bindungsstellen für Substrate und Aktivatoren [39]. In direkten Bindungsstudien konnte gezeigt werden, daß zwei Moleküle Substrat pro B_1-Untereinheit binden [42]. Schon früher war bekannt, daß jede Substratbindungsstelle von zwei Aktivatorbindungsstellen beeinflusst wird, die verschieden hohe Affinitäten zu Nucleotiden und Auswirkungen auf die Enzymaktivität haben [43]. Es binden die " high sites " mit hoher Affinität Desoxyribonucleosidtriphosphate und ATP, die die Substratspezifität des Enzyms steuern, während die " low sites " nur ATP und dATP mit geringerer Affinität als die " high sites " binden. Die " low sites " sind für den grundlegenden Zustand des Enzyms (aktiv oder inaktives Oligomer) verantwortlich. Weiterhin bestehen je nach verschiedenen gebun-

denen Nucleotiden komplexe Interaktionen zwischen allen sechs Nucleotid-Bindungszentren (Inaktiv bei dTTP und ATP nebeneinander), deren Variationsmöglichkeiten und Ursache noch unbekannt sind.

Auch für die E. coli-Ribonucleotidreduktase ist versucht worden, durch modifizierte Nucleotide ihre Spezifität für Substrat und Effektoren zu bestimmen. Neben den zuvor erwähnten, im Zucker eine reaktive Gruppe tragenden Nucleotiden sind vor allem im Phosphatrest modifizierte Nucleotide (Austausch von -O- gegen $-CH_2-$, -NH-, -S-) getestet worden [42,44]. Allgemein wirkt sich eine solche Substitution verschlechternd auf die Substrat- und Aktivatoreigenschaften aus. Diese Feststellung gilt auch für die Di- bzw. Triphosphate der Nucleosidantibiotika Tubercidin (7-Deazaadenosin), Toyocamycin und Sangivamycin, die in dieser Reihe mit steigendem Substitutionsgrad fallende bzw. keine Aktivität mit dem Enzym zeigen [45].

1.4. Aufgabenstellung dieser Arbeit

Die bisher mit einigen wenigen modifizierten Nucleotiden unternommenen Versuche, eine Erklärung der Enzymspezifität und deren Steuerung durch regulatorisch wirkende Nucleotide zu geben, konnten kein Verständnis für die zwischen Enzym und Nucleotid ablaufenden Erkennungsprozesse liefern. Die Eingriffe in die Zuckerstruktur oder Phosphatgruppen änderten die Beziehungen zum Protein so drastisch, daß feine Abstufungen der Reaktivität, wie sie für die natürlichen Nucleotide typisch sind, nicht mehr beobachtet werden konnten. Systematische Untersuchungen mit basenmodifizierten Nucleotiden sind noch nicht durchgeführt worden; es existieren in der Literatur nur einzelne Hinweise darauf, daß von den natürlichen Nucleotiden abweichende Basenstrukturen toleriert werden: Suhadolnik et al.[31,45] haben die Wirkung von phosphorylierten Nucleosidantibiotika, die in der 7-Position des Purins abgewandelt sind, auf die Ribonucleotidreduktasen aus E. coli und L. leichmannii geprüft,

ferner ist wie erwähnt sogar Benzimidazolribonucleosidtriphosphat ein Substrat für die L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase [19]. Daß sich die Struktur der Nucleobase gegenüber dem Enzym nicht nur passiv als nicht störend auswirkt, sondern aktiv die Nucleotid-Proteinbeziehungen mitbestimmt, soll in dieser Arbeit durch gezielt modifizierte Nucleotide aufgezeigt werden. Wir fordern, daß die Eigenschaften eines Substrates oder Aktivators durch die Art, Zahl und Position der exocyclischen Basensubstituenten bestimmt werden. Als Nucleotide haben wir für die Untersuchung folgender Fragestellungen ausgewählt und synthetisiert:

1. Welchen Einfluß haben die exocyclischen Basensubstituenten auf die Substrat- und Effektoreigenschaften der Nucleotide ?
Di- bzw. Triphosphate von Purinribosid, N^6-Dimethyladenosin, 2-Aminopurinribosid, 2,6-Diaminopurinribosid, 6-Thiopurinribosid, Xanthosin, Desoxyuridin, 5-Bromdesoxyuridin, Desoxyinosin und Desoxyxanthosin.

2. Überwiegt bei den Bindungszentren der Ribonucleotidreduktasen ein polarer oder hydrophober Charakter ?
Di- bzw. Triphosphate von Purin- und Benzimidazolribosid, N^6-Dimethyladenosin, Xanthosin und Desoxyxanthosin.

3. Welchen Einfluß hat die Konformation der Nucleobase auf die Substrat- und regulatorischen Eigenschaften ?
8-Bromadenosindi- und triphosphat, 8-Bromdesoxyadenosintriphosphat.

4. Ist schließlich die Einführung eines " affinity labels " in die Ribonucleotidreduktase möglich ?
Potentielle Reagentien sind die Di- bzw. Triphosphate des 6-Thiopurinribosids [46] und des N^6-(p-Fluorbenzoyl)-Adenosins [47].

Zum anderen sind heute im Rahmen der Krebsforschung große Aktivitäten zur Synthese von modifizierten Nucleosiden als Cytostatika vorhanden, die als Antimetabolite in den Nucleotidstoff-

wechsel eingreifen sollen [48]. Aus dieser Gruppe haben die Arabinonucleotide gegen schnell wachsende Tumoren eine klinische Anwendung gefunden, da sie die DNA-Synthese der Tumorzellen hemmen [30,49]. Auf molekularer Ebene scheint ihr Angriffspunkt eine Hemmung der DNA-Polymerase zu sein [50], obwohl in Bakterien offenbar differenziertere Mechanismen vorliegen [51]. Aber auch eine Hemmung von RNA-Polymerase [52] und der Ribonucleotidreduktase [53,19] sind berichtet worden. Aus physiologischer und mechanistischer Sicht war eine Klärung der Arabinonucleotid-Effekte auf die hier untersuchten Ribonucleotidreduktasen wünschenswert, sodaß die Arabinonucleosidtriphosphate des Cytosins und Adenins in die Untersuchungen miteinbezogen wurden.

Der in dieser Arbeit durchweg benutzte Enzymtest der Ribonucleotidreduktasen orientiert sich am physiologischen Geschehen und mißt die durch das Thioredoxin-System vermittelte NADPH-Oxidation (siehe Abb. 2). Er wird im folgenden als " Standardtest " bezeichnet.

2. Ergebnisse

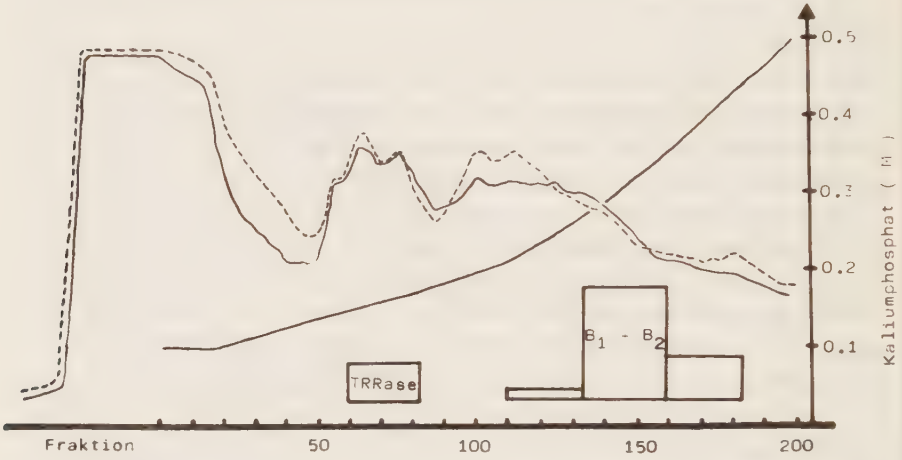
2.1. Reinigung der Ribonucleotidreduktase aus E. coli

Für die später beschriebenen kinetischen Untersuchungen der Nucleotidspezifitäten war eine weitgehende Reinigung der eingesetzten Enzyme notwendig. Die Ribonucleotidreduktase aus L. leichmannii stand mir in einer größeren Probe rein zur Verfügung (vgl. exp. Teil, 4.2.1.). In Anlehnung an die von der Arbeitsgruppe P. Reichard (Stockholm) beschriebenen Reinigung der Ribonucleotidreduktase aus E. coli [33] haben wir das Enzym in größerem Maßstab präpariert. Da es sich nicht um Routineverfahren handelt und Modifikationen anzubringen waren, wird der Gang der Reinigung hier kurz dargestellt.

Die Kultur der thyminbedürftigen E. coli Mutante B3 (ATCC 23851), die gegenüber dem Wildtyp eine fünf- bis zehnfache Ribonucleotidreduktase-Aktivität aufweist, wurde mit Hilfe der Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung in Stöckheim durchgeführt. Aus 2 kg Zellen erhält man nach Aufschluß, Streptomycinsulfat- und pH-Fällung einen Extrakt, der bei Lagerung bei - 80 ^{o}C bis zu einem Jahr verwendbar war.

Für die anschließende Chromatographie an DEAE-Cellulose wird in der Literatur ein speziell präpariertes Säulenmaterial eingesetzt, da käufliche DEAE-Cellulosen keine genügenden und reproduzierbaren Ergebnisse lieferten [54]. Uns gelang mit der käuflichen DEAE-Cellulose Whatman DE 32 eine gute, einwandfrei reproduzierbare Trennung der Enzymaktivität. Wichtig ist hierbei eine Einstellung der Proteinkonzentration auf $\leq$ 10 mg/ml und nach jeder Trennung das vom Hersteller beschriebene Anquellen der Cellulose. Die Optimierung der Trennung durch Anpassung des Phosphatgradienten mit einem LKB Ultrograd-Gradientenmischer lieferte schließlich das in Abbildung 5 dargestellte Elutionsprofil des Enzyms. Ausgehend von 2 kg E. coli-Zellen war für diesen Reinigungsschritt die Aufteilung der pH-Fällung in zehn Chargen notwendig.

Abbildung 5
Elution der E. coli-Ribonucleotidreduktase von DEAE-Cellulose mit einem Phosphatgradienten



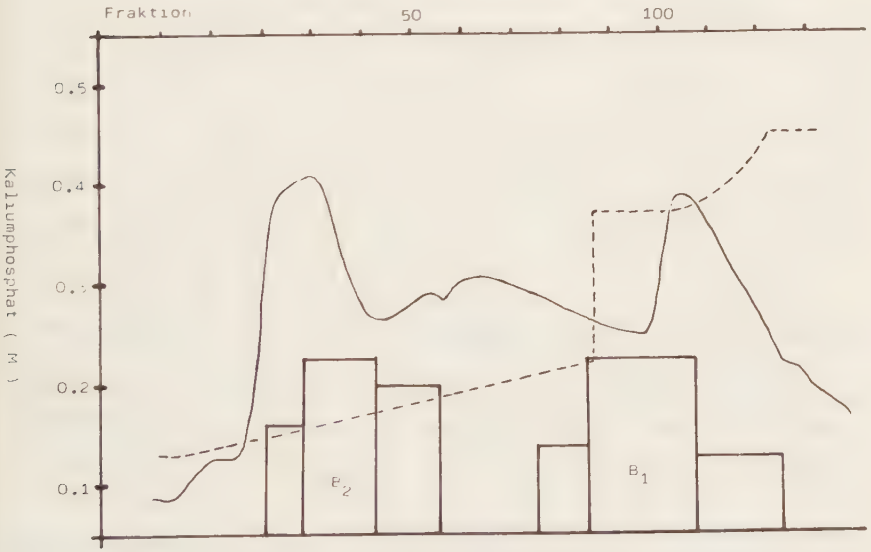
Absorption bei 280 nm (———) und 254 nm (– – – –); die Aktivität eluiert nach dem 254 nm-Absorptionsmaximum.

Aus ökonomischen Gründen haben wir versucht, auch Thioredoxin-Reduktase aus Fraktionen der 1.DEAE-Cellulosesäule zu isolieren. Obwohl in den Säuleneluaten neben der Ribonucleotidreduktase-Aktivität auch die Thioredoxin-Reduktase nachzuweisen war, konnte nach einer Hitzebehandlung dieser Fraktionen keine Thioredoxin-Reduktase-Aktivität mehr gefunden werden. Thioredoxin wurde dagegen ohne Schwierigkeiten aus dem Überstand der im Zuge der Ribonucleotidreduktase-Aufarbeitung durchgeführten pH-Fällung präpariert.

Die anschließende Chromatographie an Hydroxylapatit, bei der die Untereinheiten getrennt werden, ergab auch nach Optimierung des Phosphatgradienten keine guten Ergebnisse, da im Vergleich zur Literatur die B_2-Untereinheit über einen zu weiten

Bereich eluierte. Diese Eigenschaft war vom Begleitprotein unabhangig, da drei Chargen über Hydroxylapatit, die jeweils verschiedene spezifische Enzymaktivitäten besaßen, ein vergleichbares Verhalten zeigten. In Abbildung 6 wird das Elutionsverhalten der E. coli-Ribonucleotidreduktase auf Hydroxylapatit zusammengefaßt.

Abbildung 6
Elution der E. coli-Ribonucleotidreduktase von Hydroxylapatit

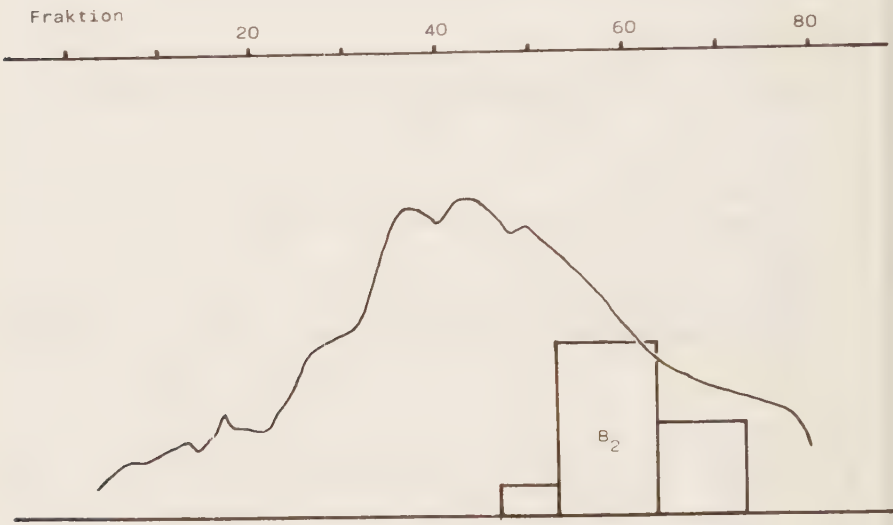


Das Elutionsprofil zeigt die Absorption von Protein bei 280 nm. Die Lage der Untereinheiten und ihre Aktivität ist eingezeichnet, ebenso der Phosphatgradient (– – – –).

Die weitere Reinigung der B_2-Untereinheit gelang über eine zweite DEAE-Cellulose-Chromatographie, die mit einem linearen Phosphatgradienten eine Abtrennung der Untereinheit von der Hauptproteinmenge leistete (Abb. 7). In drei Chargen war eine

Gesamtausbeute an B_2-Untereinheit von 0.35 g Protein mit einer spezifischen Aktivität von 500 Units/mg zu erhalten.

Abbildung 7
Chromatographie der B_2-Untereinheit an DEAE-Cellulose



Die Proteinabsorption bei 280 nm ist abgebildet. Das Protein wird mit einem linearen Phosphatgradienten (0.05 bis 0.35 M) eluiert.

Größere Schwierigkeiten waren bei der klassischen Reinigung der empfindlichen B_1-Untereinheit zu erwarten [33]. Die Verwendung eines neuen Affinitätschromatographie-Materials mit Sepharose-fixierten Aminohexyl-dATP ergab im präparativen Maßstab ausgezeichnete Erfolge [55]. Eine Ausbeute von 54 mg der B_1-Untereinheit mit einer spezifischen Aktivität von 1230 Units/mg war zu erhalten.

Die Reinigung der E. coli-Ribonucleotidreduktase ist in Tabelle 1 zusammengefaßt und der Literatur gegenübergestellt. Ein Vergleich ist jedoch nur bei den Proteinmengen möglich, da der

bei uns verwandte radioaktive Enzymtest mit (5-^{3}H)CDP mit dem in der Literatur beschriebenen [33] nicht identisch ist. Dagegen sind die von der letzten Reinigungsstufe angegebenen spezifischen Aktivitäten direkt vergleichbar, da sie mit dem gleichen spektrophotometrischen Enzymtest erhalten wurden.

Tabelle 1
Zusammenstellung der Reinigungsschritte für die E. coli-Ribonucleotidreduktase und Vergleich mit der Literatur [33,34]

Material/Reinigungsschritt		Literatur
Zellen	2000 g	800[a] g
Rohextrakt	130 g Protein	280 g Protein
pH-Fällung	90 g "	40 g "
1. DEAE-Cellulose	8.2 g "	3.15 g "
Hydroxylapatit B_2	2.85 g "	0.16 g "
B_1	2.5 g "	0.85 g "
2. DEAE-Cellulose B_2	0.35 g "	68.0 mg "
Gesamtausbeute an B_2	175 000 Units	900 000 Units
mit spez. Aktivität	500 Units/mg	13 300 Units/mg
Affinitätschromatographie B_1	54.0 mg	142.0 mg
Gesamtausbeute an B_1	65 900 Units	300 000 Units
mit spez. Aktivität	1 230 Units/mg	nicht bestimmt
Spezifische Aktivitäten der homogenen Untereinheiten		
B_1		2 400 Units/mg
B_2		14 000 Units/mg

[a]Die Literaturangaben beziehen sich auf 800 g Bakterienzellen; für einen direkten Vergleich sind die Angaben auf 2 kg Zellen umgerechnet.

Insgesamt konnten nur ca. 20% der Literaturausbeute erreicht werden. Die Gründe für diese Verluste liegen wohl darin, daß der Literaturansatz 800 g Bakterienmasse entspricht und nicht 2000 g, sodaß eine rein lineare Umrechnung zu günstige Werte vorspiegeln kann. Zum anderen dauerte diese erste Aufarbeitung drei Monate, was es unumgänglich machte, das Protein auf den einzelnen Reinigungsstufen einzufrieren. Die dabei aufgetretenen Aktivitätsverluste können die geringere Ausbeute mitbegründen. Eine jüngst publizierte, wesentlich kürzere Reinigung des Enzyms berichtet ebenfalls höhere Ausbeuten und spezifische Aktivitäten[32].

Mit den auf diese Weise gereinigten Enzymuntereinheiten B_1 und B_2 ließen sich im spektrophotometrischen, NADPH-gekoppelten Enzymtest die in der Literatur beschriebenen kinetischen Parameter des Substratumsatzes einwandfrei reproduzieren (siehe Punkt 2.5.1.). Aus diesem Grunde wurde auf eine Weiterreinigung, insbesondere der nicht Nucleotid-bindenden Untereinheit B_2 verzichtet.

2.2. Reinigung des Thioredoxin-Systems aus E. coli

Die Reinigung des Thioredoxin-Systems, das für den NADPH-gekoppelten spektrophotometrischen Enzymtest erforderlich ist (siehe Abb. 2), geschah im wesentlichen nach Literaturangaben [56] (siehe exp. Teil 4.1.2.), wobei die Reinheit beider Proteine nach der DEAE-Cellulose-Chromatographie ausreichend war. Thioredoxin dieser Reinigungsstufe besaß einen Gehalt an aktiven Protein von 50% des Gesamtproteins, die Thioredoxin-Reduktase eine spezifische Aktivität von 6 Units/mg. Die Literatur gibt für diese Reinigungsstufe eine Aktivität von 21 Units/mg an; das homogene Enzym besitzt eine spezifische Aktivität von 57 Units/mg Protein [56]. Die daraus ableitbare Reinheit der Thioredoxin-Reduktase von 10% des Gesamtproteins kann aber durchaus höher liegen, da eine homogene Enzympräparation als Bezug nicht zur Verfügung stand und der Enzymtest stark von

dem verwendeten Thioredoxin abhängig ist (siehe exp. Teil 4.2.3.). Um die Reinheit der Thioredoxin-Reduktase zu erhöhen, haben wir versucht, die Bindung des Enzymes an ADP-Sepharose auszunutzen [57]. Es zeigte sich aber, daß die Thioredoxin-Reduktase relativ unspezifisch und mit geringer Affinität an das Material gebunden wird, da eine Reinigung über ADP-Sepharose erst nach dem DEAE-Cellulose-Schritt möglich war. In früheren Reinigungsstufen verhinderten unter unseren Bedingungen Enzyme, die mit höherer Affinität an das Säulenmaterial binden, eine ausreichende Adsorption und Reinigung der Thioredoxin-Reduktase. Die auf diese Weise isolierte Thioredoxin-Reduktase besaß eine spezifische Aktivität von 15 Units/mg Protein.

2.3. Nucleotidsynthesen

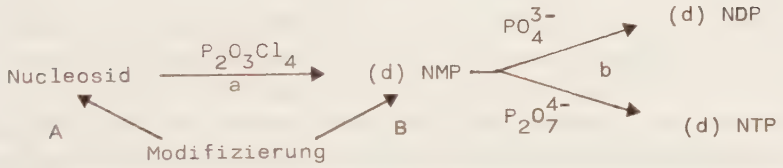
Die Darstellung der zur Messung von Enzymkinetiken vorgesehenen modifizierten Nucleotide war in einigen Fällen beschrieben, in anderen Fällen konnte in Anlehnung an übliche Verfahren das gewünschte Nucleotid erhalten werden. Modifizierungsreaktionen wurden nur auf der Nucleosid- oder 5'-Monophosphatstufe durchgeführt, da bei Di- oder Triphosphaten die völlige Trennung von Ausgangs- und Endprodukten problematisch wird. So gelang die Desaminierung von dGMP mit salpetriger Säure zu dXMP analog der Vorschrift von Reist et al.[58], obwohl bei längerer Reaktionszeit in großem Maße N-Glykosidspaltung des säurelabilen dXMP stattfindet. Gleichermaßen konnte das 2,6-Diaminopurinribosid analog Robins et al. [59] aus dem 2-Amino-6-chlorpurinribosid erhalten werden. Größte Sorgfalt verwendeten wir darauf, absolut reine Nucleosiddi- und triphosphate zu erhalten, da die Ausgangsstoffe oft schon Aktivitäten gegenüber dem Enzym zeigen. Die in der Literatur beschriebenen Reinigungsschritte genügten teilweise unserem Anspruch nicht, was beispielsweise bei der Befolgung der Vorschrift zur Darstellung von N^6-(p-Fluorbenzoyl)-adenosinmonophosphat besonders auffiel [47].

In der Regel führten wir Reaktionsgemisch-Trennungen auf der Nucleosidmonophosphat-Stufe durch, da die Reaktion von Nucleosiden mit Pyrophosphorylchlorid nach Imai et al.[60] bei geringem Aufwand so gute Monophosphat-Ausbeuten lieferte, daß nur noch die Entsalzung über Aktivkohle und nachfolgende Säulentrennung für die Ausbeute ausschlaggebend waren. Zum anderen ist die Chromatographie an Dowex-Anionenaustauscher-Säulen mit dem Formiat-System so leistungsfähig, daß alle Nucleoside, Nucleotide und Nucleotidgemische mit einem Ameisensäuregradienten getrennt werden können. Verluste entstanden an diesen Stellen für s^6PuMP, da es irreversibel zu etwa 70% an Aktivkohle gebunden wird; dieses Effektes bedienten wir uns andererseits bei der Auftrennung des Reaktionsgemisches von s^6GMP und a^2PuMP, da der Ausgangsstoff nahezu quantitativ an Aktivkohle gebunden blieb. Weiter waren Einbußen für fbzAMP und s^6PuMP bei der Säulenchromatographie unumgänglich, da sie sehr stark an dem Säulenmaterial haften und nur mit erhöhter Salzkonzentration zu eluieren waren, was eine Entsalzung über einen Kationenaustauscher (Dowex 50 H^+) nötig machte.

Die anschließende Phosphorylierung zum Nucleosiddi- bzw. Triphosphat nach Hoard und Ott [61] gab bei sorgfältiger Herstellung der zu koppelnden Mono- bzw. Pyrophosphatkomponente gute Ausbeuten von über 70%. Die Trennung der verschiedenen Phosphorylierungsstufen gelingt an DEAE-Cellulose durch Elution mit Triäthylammoniumbikarbonat-Puffern.

Obwohl an DEAE-Cellulose die verschiedenen Phosphorylierungsstufen der Nucleotide gut zu trennen sind, war es uns nicht möglich, ATP und br^8ATP an DEAE-Cellulose ausreichend zu separieren. Auch die in der Literatur beschriebene Trennung über einen Dowex 1x8 Anionenaustauscher mit einem Lithiumchlorid-Salzgradienten genügte uns nicht [62]. In diesem Fall bewährte sich die Trennung auf der Monophosphat-Stufe und nachfolgende Phosphorylierung. Tabelle 2 gibt eine Zusammenstellung aller in dieser Arbeit präparierten Nucleotide mit dem Herstellungsweg. Einzelheiten sind im exp. Teil unter 4.4. beschrieben.

Tabelle 2
Dargestellte Nucleotide und ihre Synthesewege



Nucleosid-	DP	TP	Syntheseweg (aus)
Purinribosid	+	+	a, b
Benzimidazolribosid	+		a, b
N^6-Dimethyladenosin	+	+	a, b
8-Bromadenosin	+	+	B (AMP), b
8-Bromdesoxyadenosin		+	B (dAMP), b
Desoxyxanthosin		+	B (dGMP), b
N^6-(p-Fluorbenzoyl)-adenosin	+	+	B (AMP), b
2-Aminopurinribosid	+	+	A (s^6Guanosin) a,b
2,6-Diaminopurinribosid	+	+	A (a^2-,Cl^6-Purinribosid) a, b
6-Thiopurinribosid	+	+	a, b
Arabinoadenosin	+	+	a, b
Arabinocytidin	+	+	b

2.4. Spezifität der Ribonucleosidtriphosphat-Reduktase aus Lactobacillus leichmannii

2.4.1. Modifizierte Ribonucleosidtriphosphate

Die Frage nach den Strukturansprüchen des aktiven (katalytischen) Zentrums der Ribonucleotidreduktase aus L. leichmannii für die Base eines Nucleotids haben wir versucht, mit folgenden, dem ATP bzw. GTP analogen Purinnucleosid-5'-triphosphaten anzugehen: Dem substituentenlosen Purinribosidtriphosphat (PuTP), dem durch zweifache Methylierung in der Aminofunktion ohne einen Wasserstoffdonor verbliebenen N^6-Dimethyladenosintriphosphat (m_2^6ATP), dem in der syn-Konformation der Nucleobase vorliegenden 8-Bromadenosintriphosphat (br^8ATP) und dem bei neutralen pH-Wert in der Base negativ geladenen Xanthosintriphosphat (XTP). Die Effekte auf die Ribonucleotidreduktase aus L. leichmannii sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3
Substrateigenschaften von modifizierten Nucleotiden gegenüber der Ribonucleotidreduktase aus L. leichmannii

Nucleotid	Relative Reaktionsgeschwindigkeit allein	+ Aktivator	Kinetische Daten[a] $K_{m(app.)}$	V_{max}
ATP	20	104 (dGTP)	0.22 mM	0.397 nkat
m_2^6ATP	0.1	5 (dGTP)	0.35 mM	0.035 nkat
PuTP	0.1	19 (dGTP)	0.67 mM	0.172 nkat
br^8ATP	0	0 (--)	-	-
XTP^-	0	0 (--)	-	-
XTP^o	16 [b]	36[b] (dTTP)	nicht bestimmbar	

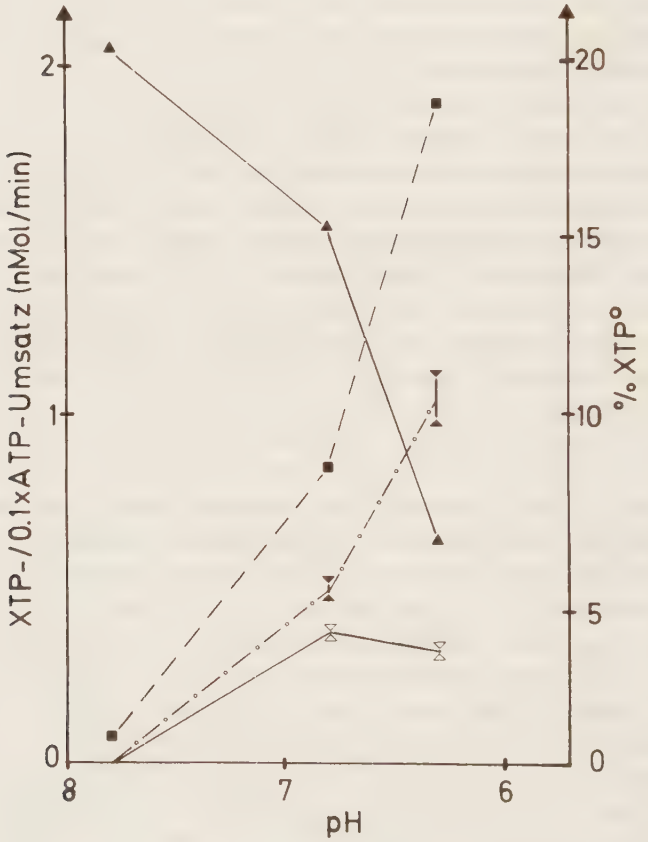
[a] Aktivator: dGTP. [b] Für 100% ungeladene Base aus pH-Abhängigkeit extrapoliert. Bedingungen des Standardtest (siehe 4.2.1.)

Aus den Daten wird ersichtlich, daß eine Blockierung oder gar ganzliche Entfernung der 6-Aminofunktion die Substrateigenschaften im Vergleich zu ATP stark verringert, eine Aktivierung durch das gleiche Desoxyribonucleotid (dGTP) jedoch noch stattfindet. Wie schon zuvor gezeigt sind lineare kinetische Abhangigkeiten des dGTP-aktivierten Umsatzes von m_2^6ATP und PuTP bestimmbar, die charakteristische Unterschiede in $K_{m(app.)}$ und V_{max} zugleich aufweisen.

Dagegen besitzt das 8-Brom-Analoge des ATP weder im spektrophotometrischen Test, noch bei Inkubation mit hohen Enzymkonzentrationen über 24 Stunden erkennbare Substrateigenschaften, worauf auch Aktivatoren keinen Einfluß haben. Daraus ist zu schließen, daß das br^8ATP auf Grund der besonderen syn-Konformation seiner Nucleobase kein Substrat der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase sein kann, denn der Bromsubstituent allein sollte keine völlige Inaktivität als Substrat verursachen.

Das letzte Substratanaloge dieser Reihe, XTP, das durch seine Struktur eine Mittelstellung zwischen GTP und ITP einnehmen könnte, zeigt eine ungewöhnliche pH-Abhängigkeit, die der eines typischen Substrates wie ATP entgegengesetzt verläuft. Da XTP bei dem pH-Wert des Enzymtests (7.8) eine zusätzliche Ladung in der Base trägt (pK_a von Xanthin = 5.7; diese Spezies nennen wir XTP^-, die nicht deprotonierte XTP^o), die Reaktionsgeschwindigkeit mit fallendem pH-Wert aber ansteigt, muß man annehmen, daß eine Reduktion der bei fallendem pH-Wert in größerem Maße im Gleichgewicht vorhandenen ungeladenen Spezies XTP^o stattfindet. Dieser Umsatz wird durch dTTP spezifisch stimuliert. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich gehen demnach mit einer Korrektur für die bei niedrigerem pH-Wert fallende Enzymaktivität die Steigerung der Reduktionsgeschwindigkeit und die Zunahme von XTP^o tatsächlich parallel. Die angegebenen relativen Reaktionsgeschwindigkeiten sind für 100% XTP^o berechnet; kinetische Parameter waren aus den nur geringen, meßbaren Effekten nicht zu bestimmen.

Abbildung 8
Abhängigkeit der XTP-Reduktion vom pH-Wert



XTP+dTTP-Umsatz gemessen (————————); ATP+dGTP-Umsatz x 0.1 nMol/min (—— ▲ ——); Prozent XTP° ohne Ladung in der Base (— — ■ — —); korrigierter XTP-Umsatz (— ∘ — ∘ — ∘ —), erhalten durch Multiplikation mit dem Faktor (ATP+dGTP-Umsatz bei pH 7.8 dividiert durch ATP+dGTP-Umsatz bei pH X). Bedingungen des Standardtest (siehe 4.2.1.)

2.4.2. In der Base modifizierte Desoxyribonucleotide als Aktivatoren

Die besondere syn-Konformation des br^{8}ATP und das eine zusätzliche negative Ladung tragende XTP lassen wichtige Strukturansprüche des aktiven Zentrums der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase erkennen. Ein direkter Vergleich mit den Strukturansprüchen der regulatorischen Zentren war von Interesse, weshalb die analogen Desoxyribonucleotide br^{8}dATP und dXTP synthetisiert und in ihrer Wirkung auf das Enzym getestet wurden. In Tabelle 4 sind ihre Effekte zusammen mit den bereits beschriebenen von dGTP, dCTP, dATP [18] und den unter diesen Gesichtspunkt noch nicht untersuchten Nucleotiden dUTP und dITP wiedergegeben. Die Konzentration der Desoxyribonucleotide liegt stets im Sättigungsbereich, sodaß eine Kombination mit den aus der Literatur übernommenen Daten möglich ist.

Das dUTP entspricht in seiner Wirkung dem in vivo offenbar nicht benötigten Aktivator dTTP (siehe Schema S. 7); die fehlende Methylgruppe des dTTP im dUTP wird vom Enzym nicht erkannt. Dagegen zeigt dITP nur im Falle des ATP-Umsatzes eine dem dGTP vergleichbare Spezifität in der Aktivierung, während es auf andere Ribonucleotide nicht mehr stimulierend wirkt. Das br^{8}dATP zeigt andererseits deutlich eine dATP vergleichbare Spezifität in seinem Einfluß auf die CTP-Reduktion, was auf Grund der sorgfältigen Reinigung des br^{8}dATP keine Wirkung von verunreinigenden dATP mehr sein kann. Vielmehr belegen die mangelnde Hemmung von br^{8}dATP auf den ATP-Umsatz (wie für dATP gültig) als auch die neue leichte Umsatzsteigerung der ITP-Reduktion, daß hier tatsächlich andere Beziehungen vorhanden sind.

Eine Sonderstellung nimmt wieder dXTP ein, da dessen umsatzsteigernde Wirkung auf die ATP-, CTP- und ITP-Reduktion mit fallendem pH-Wert zunimmt, was auf eine Stimulierung durch die bei pH 6.3 in einer Konzentration von ungefähr 1 mM vorliegenden Spezies dXTP$^{\circ}$ hindeutet. Andererseits ist dieser Effekt nicht so ausgeprägt wie für XTP$^{\circ}$ an der Substratbindungsstelle.

Tabelle 4 Einfluß von Desoxyribonucleosid-triphosphaten auf die Substrat-Reduktion durch L. leichmannii - Ribonucleotidreduktase
Stimulierung um Faktoren ≥2 ist durch Unterstreichen gekennzeichnet

Substrat	allein	+dATP	+br^{8}dATP	+dCTP	+dTTP	+dUTP	+dGTP	+dITP	+dXTP [a] pH 7.8	+dXTP [a] pH 6.3
ATP	20	15	20	15	17	17	<u>104</u>	<u>38</u>	20	27
CTP	36	<u>102</u>	<u>70</u>	32	32	32	41	27	43	54
UTP	14	14	14	<u>37</u>	17	17	23	6	9	9
XTP [b]	16				<u>36</u>	<u>33</u>				
ITP	6	6	<u>11</u>	7	<u>38</u>	<u>38</u>	5	5	6	9

[a] Konzentration von dXTP 5 mM. [b] Berechnet für 100% ungeladenes XTP (XTP^{o}, siehe Tabelle 2); andere Desoxyribonucleotide zeigen keinen signifikanten Einfluß auf die XTP-Reduktion.

Bedingungen: Coenzym B_{12} 8µM, Substrat und Effektor jeweils 2 mM, pH 7.8, 25 ^{o}C.
Weitere Einzelheiten des Standardtests im experimentellen Teil.

Bezugswert: Eine GTP-Reduktion von 100 entspricht 0.085 nkat

2.4.3. Wirkung von Arabinonucleosidtriphosphaten

Arabinonucleotide stehen strukturell zwischen Ribo- und Desoxyribonucleotiden und wurden aus den oben erwähnten Gründen (S.12) in die Untersuchung einbezogen. Im Hinblick auf eine physiologische und mechanistische Bewertung ihrer Wirkung muß der Konzentrationsbereich, in dem eine signifikante Hemmung der Enzymaktivität auftritt und die Wirkung auf andere kinetische Parameter analysiert werden. Die konzentrationsabhängige Hemmwirkung von araATP und araCTP auf den Substratumsatz verschiedener Ribonucleotide ist in Tabelle 5 zusammengefaßt, wobei als Maß des Effektes eine Inhibierung der Substratreduktion um 50% angegeben ist.

Tabelle 5
Inhibitorkonzentrationen bei 50% Hemmung der Substratreduktion

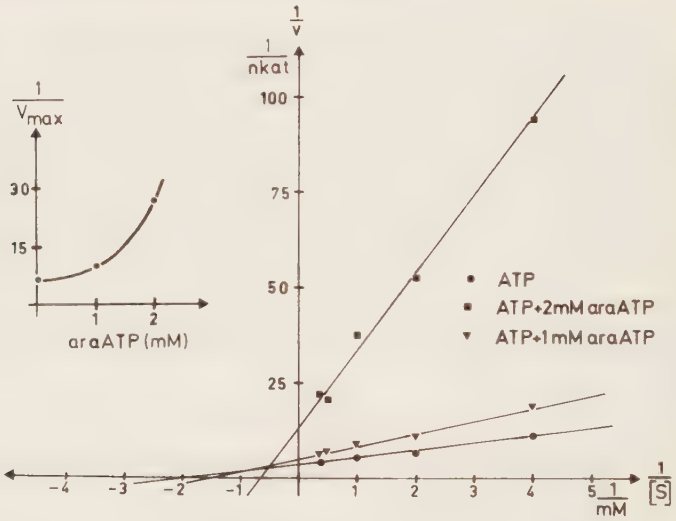
Substrat (2 mM)	Inhibitor	50% Hemmung bei Inhibitorkonzentration	Inhibitor / Substrat
CTP	araCTP	6 mM	3
ATP	araCTP	4 mM	2
UTP	araCTP	3 mM	1.5
ATP	araATP	2 mM	1
UTP	araATP	2 mM	1

Bedingungen: 75 µg Enzym, 4 µM Coenzym B_{12}, pH 7.8, 25 °C

Die Werte zeigen an, daß araCTP schwächer hemmt als araATP und bei den einzelnen Substraten in unterschiedlicher Effektivität. Dagegen hemmt araATP die beiden Substrate ATP und UTP bei gleicher Konzentration. Ein unterschiedliches Verhalten von araATP und araCTP wird besonders deutlich, nimmt man Enzymkinetiken in Gegenwart verschiedener Inhibitorkonzentrationen auf. Aus der doppelt reziproken Auftragungsweise in Abbildung 9 und 10 geht

Abbildung 9

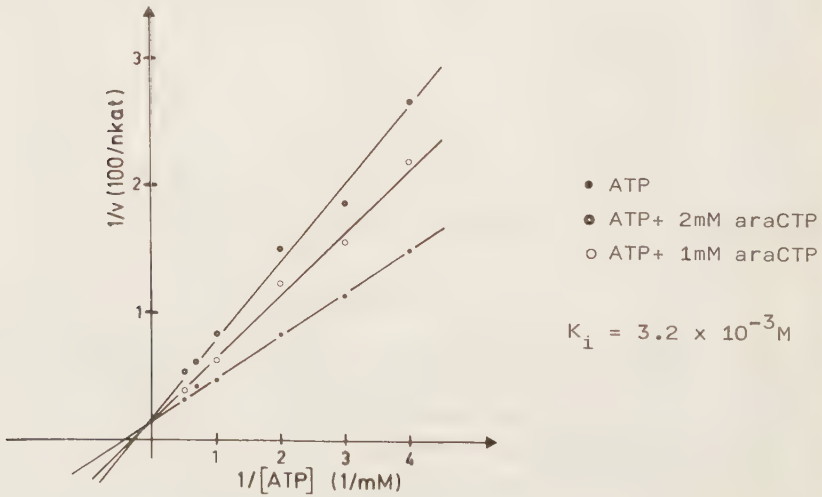
ATP-Reduktion in Gegenwart von araATP



Bedingungen: 97 µg Enzym, 4 µM Coenzym, pH 7.8, 25 °C

Abbildung 10

ATP-Reduktion in Gegenwart von araCTP



$K_i = 3.2 \times 10^{-3} M$

Bedingungen: 75 µg Enzym, 4 µM Coenzym, pH 7.8, 25 °C

hervor, daß araATP den ATP-Umsatz in nicht-kompetitiver Form hemmt (das sekundäre Diagramm ist nichtlinear), dagegen araCTP die ATP-Reduktion in gleicher Konzentration wie araATP in kompetitiver Weise inhibiert (Abb. 10).

Wichtig für den Wirkungsmechanismus von araATP ist ferner die Frage, wie ein zusätzlicher allosterer Aktivator die Enzymhemmung beeinflußt. Eine nicht-kompetitive Enzymhemmung wird oft über eine allostere Bindungsstelle am Enzym bewirkt, sodaß bei einem solchen Mechanismus der Aktivator die Hemmung durch araATP verändern müßte. Die Tabelle 6 beschreibt die konzentrationsabhängige Hemmung des aktivierten Substratumsatzes durch araATP und araCTP.

Tabelle 6
Hemmung des aktivierten Substratumsatzes durch Arabinonucleotide

Substrat und Aktivator (je 2 mM)	Inhibitor	50% Hemmung bei Inhibitorkonzentration	Inhibitor / Substrat
CTP + dATP	araCTP	12 mM	6
ATP + dGTP	araCTP	12 mM	6
UTP + dCTP	araCTP	3 mM	1.5
ATP + dGTP	araATP	2 mM	1
UTP + dCTP	araATP	2 mM	1

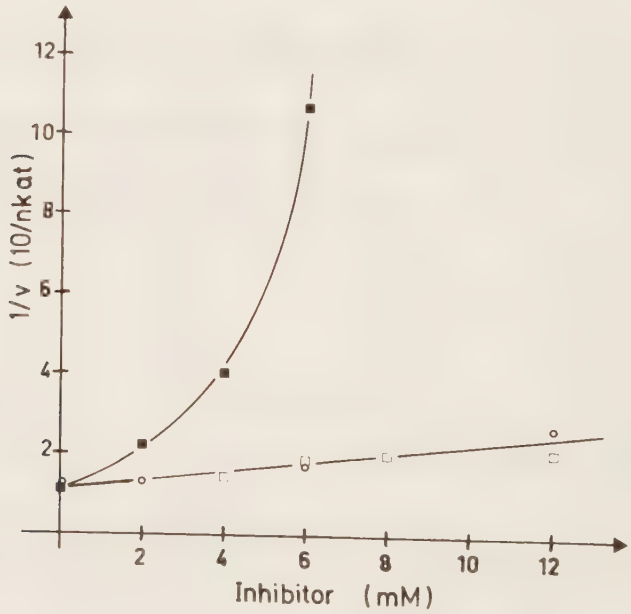
Bedingungen: siehe Tabelle 5

Der zusätzliche Aktivator verändert demnach die Hemmwirkung von araATP nicht; die geringere Inhibierung durch araCTP tritt in Gegenwart des Aktivators noch klarer hervor.

Trägt man steigende Inhibitormengen gegen die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit auf, sollte man in Anlehnung an die sekundären Diagramme eine Aussage darüber erhalten, ob die Wirkung der Arabinonucleotide auf den aktivierten Substratumsatz

kompetitiver oder nicht-kompetitiver Art ist (Abb. 11). Neben der auch aus Tabelle 6 zu entnehmenden geringeren Hemmwirkung des araCTP fällt die lineare Abhängigkeit der araCTP-Wirkung von der Inhibitorkonzentration auf, während araATP in dieser Darstellungsweise wieder eine nicht-kompetitive Hemmung nahelegt. Der Aktivator scheint demnach keinen Einfluß auf den Typ der araATP-Hemmung zu nehmen; diese Befunde entsprechen den zuvor ohne Aktivator gefundenen Effekten. Die Konsequenzen aus diesem Verhalten sollen später im Zusammenhang mit den Modellvorstellungen für allostere Enzyme diskutiert werden.

Abbildung 11
Wirkung von Arabinonucleotiden auf die aktivierte Substratreduktion



■ araATP / ATP+dGTP, □ araCTP / ATP+dGTP, o araCTP / CTP+dATP

Bedingungen: 75 µg Enzym, 4 µM Coenzym, 2 mM Substrat und Aktivator, pH 7.8, 25 °C

2.4.4. Aktivität von modifizierten Nucleotiden im Tritiumaustausch

Eine zusätzliche Möglichkeit zur Untersuchung der L. leichmanii-Ribonucleotidreduktase-Reaktion bietet der Nucleotid-katalysierte Austausch von Tritium-Markierung der 5'-Methylengruppe des Coenzym B_{12} gegen Protonen des als Reaktionsmedium vorhandenen Wassers. Dieser Test gibt weniger Auskunft über die Substratreduktion als vielmehr über die Fähigkeit eines Nucleotids, an die allosteren Zentren des Enzyms zu binden. In Tabelle 7 sind die Einflüsse der Nucleosidtriphosphate auf die Freisetzung von Tritium aus dem (5'-^{3}H) Desoxyadenosylcobalamin zusammengestellt.

Tabelle 7
Enzym-katalysierter Tritiumaustausch von (5'-^{3}H) Desoxyadenosylcobalamin in Wasser durch Nucleosidtriphosphate

Nucleotid	pH	Radioaktivität	Nucleotid	pH	Radioaktivität
dGTP	7.3	602 000 dpm	dATP	7.3	167 000 dpm
dGTP, ohne Enzym	7.3	1 600 "	br^{8}dATP	7.3	5 000 "
dGTP, ohne Dihydroliponsäure	7.3	1 800 "	dXTP	7.3	4 200 "
ATP	7.8	429 000 "	XTP	7.8	39 800 "
ATP	7.3	396 000 "	XTP	7.3	35 200 "
ATP	6.8	317 000 "	XTP	6.8	22 500 "
br^{8}ATP	7.3	4 400 "	dTTP	6.8	14 700 "
m_2^6ATP	7.3	24 300 "	XTP+dTTP	6.8	162 000 "
PuTP	7.3	83 900 "			

Bedingungen: 15 µg Enzym, 50 µM markiertes Coenzym, 30 mM Dihydroliponsäure, 2 mM Nucleotide; Inkubation 15 min bei 37 °C. Die Ergebnisse sind als Gesamtradioaktivität des Wassers (0.5 ml) unter den Testbedingungen angegeben (siehe exp. Teil 4.2.1.)

Da die Testbedingungen der Literatur weitgehend angeglichen waren, konnten ähnliche Austauschaktivitäten für die Bezugssubstanzen dGTP, dATP und ATP wie in der Literatur erhalten werden [19,26].

Die modifizierten Ribonucleotide m_2^6ATP und PuTP zeigen ähnlich ihrem Substratverhalten einen Tritiumaustausch, der deutlich unter der Aktivität des ATP liegt. In Übereinstimmung mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen katalysiert br^{8}ATP keinen signifikanten Tritiumaustausch. Davon unterschiedlich sind die Desoxyribonucleotide br^{8}dATP und dXTP im Austausch nahezu inaktiv, wirken aber im spektrophotometrischen Test als Aktivatoren (siehe Tabelle 4).

Eine Sonderstellung nimmt hier wieder das XTP ein, da es im Tritiumaustausch keine Steigerung des Effektes mit fallendem pH-Wert zeigt, sondern parallel der pH-Abhängigkeit des ATP mit steigendem pH-Wert stärker den Austausch katalysiert. Dieser Befund steht im Gegensatz zum Verhalten des XTP im spektrophotometrischen Test, was darauf schließen läßt, daß an den regulatorischen Zentren des Enzyms eine negative Ladung der Xanthin-Base eine Wechselwirkung nicht verhindert.

Als weiteres wichtiges Ergebnis wurde in diesen Experimenten erstmals ein Fall beobachtet, bei dem sich eine Umsatzaktivierung durch ein Desoxyribonucleotid auch in einem erhöhten Tritiumaustausch widerspiegelt. Das für sich allein wenig aktive Substrat XTP konnte durch seinen spezifischen Aktivator dTTP (siehe Tabelle 4) zu einer mehrfachen Austauschaktivität stimuliert werden, die über der Summe der Einzelaktivitäten für XTP und dTTP liegt. Offensichtlich ist eine Steigerung des Tritiumaustausches in Nucleotid-Kombinationen nur bei langsamen Substraten sichtbar, nicht aber bei den natürlichen Nucleotiden.

2.5. Spezifität der Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase aus Escherichia coli

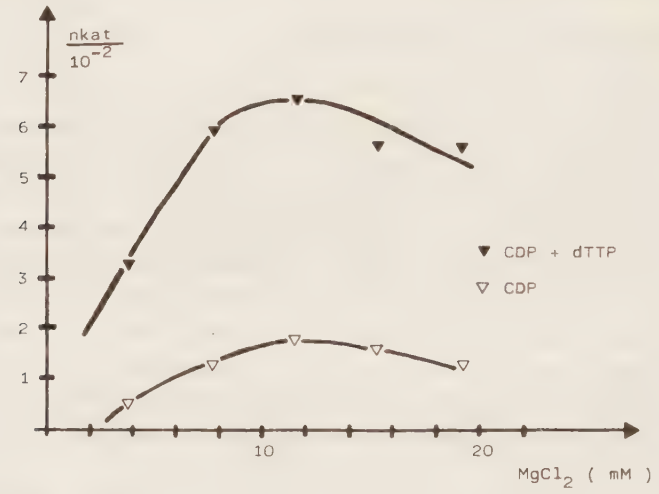
2.5.1. Bedingungen der Enzymkinetik

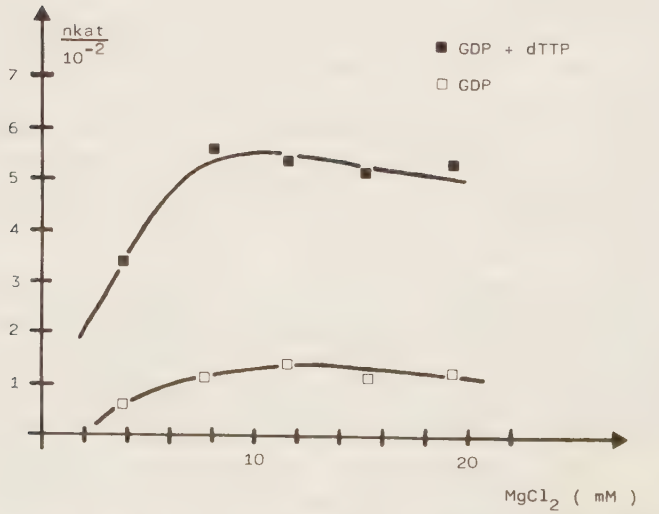
Der in der Literatur beschriebene spektrophotometrische Enzymtest [40,44] orientiert sich wie bei der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase am physiologischen Geschehen; die vom Thioredoxin-System vermittelte NADPH-Oxidation als Maß der Ribonucleotidreduktion wird verfolgt. Dieser Enzymtest liegt den folgenden Resultaten zu Grunde, nur mußte gewährleistet sein, daß in jedem Fall die modifizierten Nucleotide und nicht Thioredoxin oder die Enzymuntereinheiten die Reduktionsgeschwindigkeit bestimmten. Deshalb haben wir die wichtigsten Parameter des Enzymtests unter unseren speziellen Bedingungen überprüft.

Neben dem in Sättigung benötigten Thioredoxin-System hängt die Enzymaktivität wegen der Untereinheiten-Struktur von der Magnesiumionenkonzentration ab. Da Magnesiumionen unterschiedlich stark von Purin- und Pyrimidinnucleotiden komplexiert werden, haben wir für CDP und GDP die Abhängigkeit der enzymatischen Katalyse von der Magnesiumionenkonzentration unter Standardbedingungen erneut aufgenommen (Abb. 12). In Übereinstimmung mit der Literatur wird eine optimale Magnesiumkonzentration um 11 mM $MgCl_2$ beobachtet und dieser Wert für alle weiteren Messungen beibehalten.

Ebenso sorgfältig muß das Verhältnis der Untereinheiten festgelegt werden, da eine Veränderung Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt. Prinzipiell besteht kein Unterschied, ob man die B_1- oder die B_2-Untereinheit in höherer Konzentration dosiert, aus praktischen Gründen wird jedoch die B_2-Untereinheit im Überschuß zugegeben, da sie bei der Präparation in höherer Ausbeute anfällt. In Abbildung 13 ist der Einfluß steigender B_2-Konzentrationen auf den CDP- und GDP-Umsatz unter Standardbedingungen festgehalten.

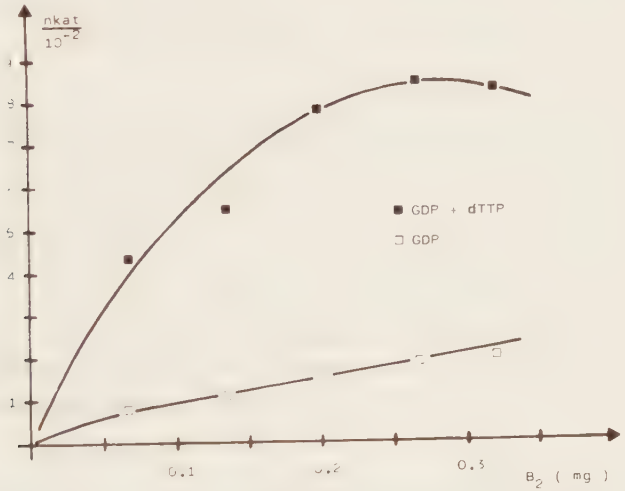
Abbildung 12
Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Magnesiumionenkonzentration

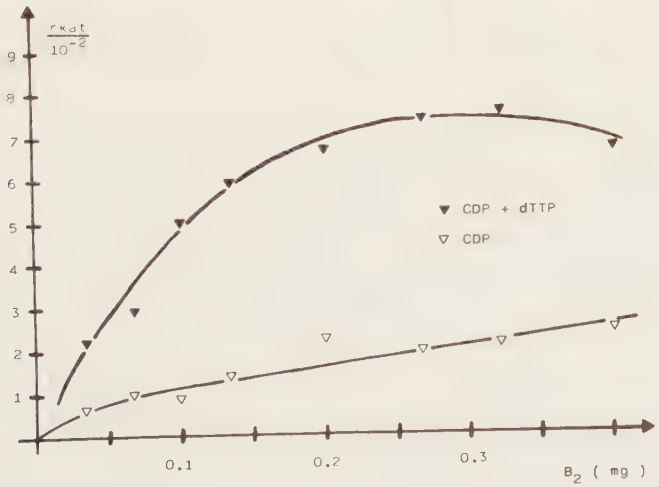




Bedingungen: 38 µg B_1, 0.2 mg B_2, 0.5 mM Substrat, dTTP 0.04 mM, pH 7.6, 25 °C

Abbildung 13
Abhangigkeit der Reduktionsgeschwindigkeit von der B_2-Konzentration





Bedingungen: 38 µg B_1, 11.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM Substrat, 0.04 mM dTTP, pH 7.6, 25 °C

Bezeichnend ist der Einfluß des Aktivators dTTP, der unter diesen Bedingungen ein Sättigungsverhalten gegenüber der B_2-Untereinheit ab 0.2 mg B_2 verursacht, während ohne Aktivator in dem verfolgten Konzentrationsbereich die Reaktionsgeschwindigkeit linear mit der B_2-Konzentration ansteigt.

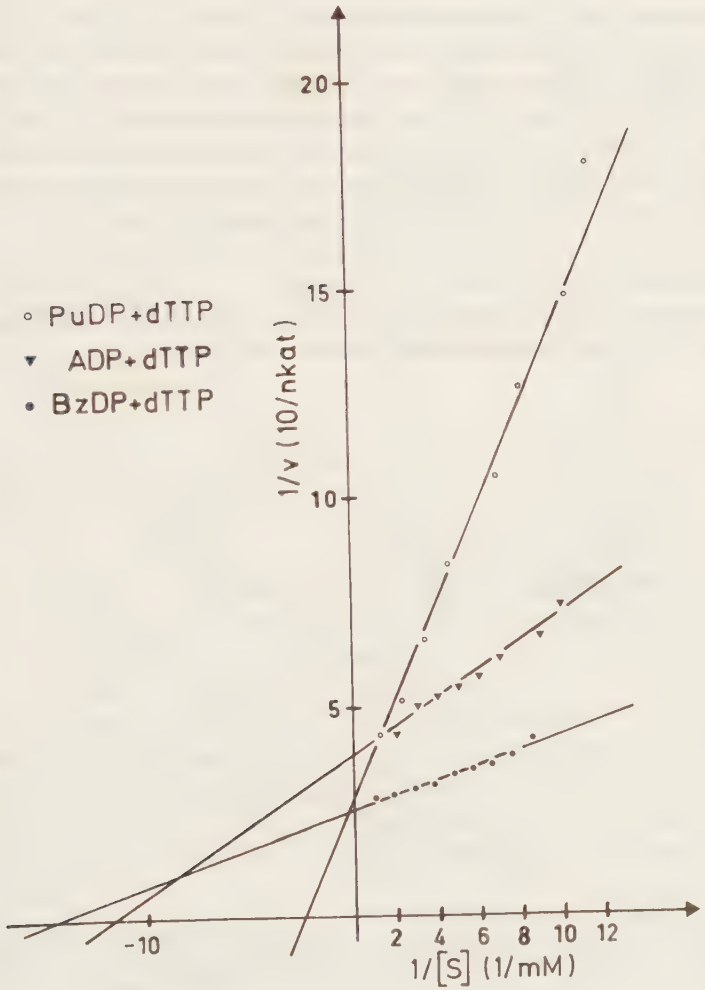
Die folgenden Resultate wurden alle mit derselben Enzympräparation erhalten. Eine weitgehend vergleichbare Enzymaktivität konnte gewährleistet werden, da die Gesamtmenge der zuvor dialysierten Untereinheiten in kleine Portionen aufgeteilt und unter Zusatz von 30% Glycerin bei -18 °C aufbewahrt wurde. Über zwei Monate war kein merklicher Aktivitätsverlust der Untereinheiten zu verzeichnen, wenn die entnommene Enzymportion innerhalb eines Tages verwendet wurde. Alle Ergebnisse des spektrophotometrischen Tests sind unter den im experimentellen Teil (4.2.2.) beschriebenen Standardbedingungen aufgenommen worden.

2.5.2. Nucleosiddiphosphate als Substrate der E. coli-Ribonucleotidreduktase

2.5.2.1. Basenmodifizierte Nucleotide mit Substrateigenschaften

Zur Klärung der Strukturspezifität von E. coli-Ribonucleotidreduktase für ihre Substrate haben wir eine Serie von Purinnucleosiddiphosphaten auf ihre Substrateigenschaften hin untersucht. Da als Ursache der unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten (beispielsweise GDP und ADP) von uns die Art, Zahl und Position der ausbildbaren Wasserstoffbrücken von der Nucleobase zum Enzymprotein verantwortlich gemacht werden, wurden als Bezugssubstanzen zur Interpretation dieser Beiträge das unsubstituierte Purinnucleosid- bzw. das noch weniger polare Benzimidazolribonucleosiddiphosphat ausgewählt und mit der E. coli-Ribonucleotidreduktase getestet. Die beiden Nucleotide PuDP und BzDP werden von dem Enzym reduziert; in Abbildung 14 ist ihr durch dTTP aktivierter Umsatz in der doppelt reziproken Auftra-

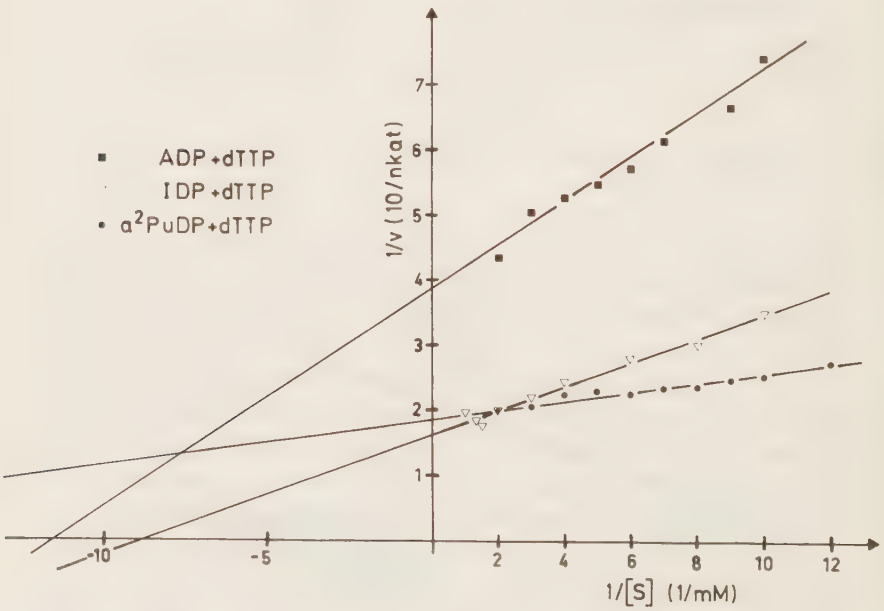
Abbildung 14
dTTP-aktivierter Umsatz unsubstituierter Purinanaloger im Vergleich zu ADP + dTTP



Bedingungen: 38 µg B_1, 0.2 mg B_2, 11.5 mM $MgCl_2$, 0.04 mM dTTP, pH 7.6, 25 °C

gungsweise wiedergegeben und mit der dTTP-aktivierten Reduktion von ADP verglichen. Die verschiedenen scheinbaren K_m-Werte sind ersichtlich; aber auch V_{max} der Analogen gegenüber der ADP-Reduktion ist unterschiedlich. Unerwartet verhält sich bei diesem Vergleich das BzDP als gutes Substrat, und trotz erheblicher Affinitätsunterschiede im Vergleich zu PuDP (siehe $K_{m(app.)}$ in Tab. 8) besitzt V_{max} für beide Substrate fast denselben Wert, der noch über dem des ADP liegt. Diese Befunde legen den Schluß nahe, daß im aktiven Zentrum der E. coli-Ribonucleotidreduktase unpolare Nucleotide (BzDP) bevorzugt akzeptiert werden, besser noch als solche mit polarem Aufbau (PuDP) oder mit zusätzlichen Substituenten (ADP).

Abbildung 15
Einfluß der Art und Position des Substituenten von ADP-Analogen auf die Substrateigenschaften im aktivierten Umsatz



Bedingungen: 38 µg B_1, 0.2 mg B_2, 11.5 mM $MgCl_2$, 0.04 mM dTTP, pH 7.6, 25 °C

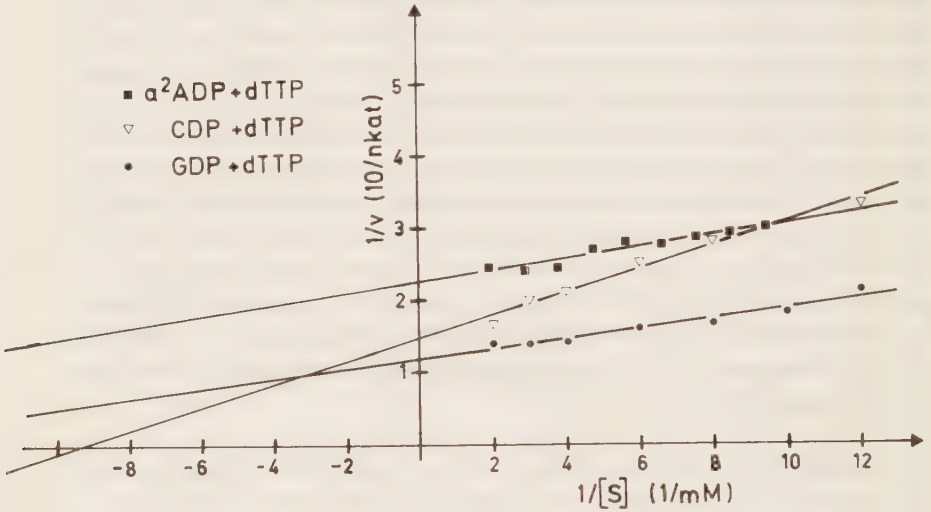
Da ein solches Verhalten unseren eingangs gestellten Forderungen widersprechen würde, war es wichtig zu wissen, wie sich im Vergleich zu ADP ein Positionswechsel des Substituenten (a^2PuDP) oder ein Austausch gegen eine Carbonylfunktion (IDP) auf die Substrateigenschaften auswirkt. Das Enzym reduziert auch diese beiden Nucleotide, im Falle des IDP mit einer unter den Standardbedingungen dem ADP vergleichbaren Geschwindigkeit. Dagegen wird das dem ADP isomere a^2PuDP so rasch reduziert, daß es unter den in vitro-Bedingungen noch schneller als die natürlichen Nucleotide umgesetzt wird (siehe Tab. 10). Diese Eigenschaft geht beim dTTP-aktivierten Umsatz verloren, andererseits wird jetzt das IDP effektiv reduziert. In Abbildung 15 sind die dTTP-aktivierten Umsätze von IDP und a^2PuDP, sowie zum Vergleich der von ADP+dTTP im doppelt reziproken Diagramm dargestellt. Demnach erscheinen die Art und Position der exocyclischen Substituenten doch von entscheidender Bedeutung für die Substrateigenschaften.

Um Aussagen über die Wechselwirkung von zwei Substituenten der Nucleobase (wie im GDP) mit dem Protein machen zu können, muß man Substratanaloge wie beispielsweise " Isoguanosin " oder "Isocytidin ", in denen die Lage der Amino- und Carbonylfunktionen vertauscht sind, auf ihre Substrateigenschaften prüfen. Diesen Untersuchungen sind von der praparativen Seite her Grenzen gesetzt, da solche Nucleotidanaloge nur mit großem synthetischen Aufwand zugänglich sind. Deshalb wurde hier neben den natürlichen Nucleotiden CDP und GDP nur noch das 2,6-Diaminopurinnucleosiddiphosphat (a^2ADP) in die Untersuchungen einbezogen. Auch Xanthosindiphosphat würde in diese Gruppe gehören, jedoch spielt hier die negative Ladung in der Nucleobase bei pH 7.6 die ausschlaggebende Rolle und läßt einen Vergleich nicht zu.

Der Austausch der Carbonylfunktion im GDP durch eine weitere Aminogruppe wie im a^2ADP reduziert die Reaktionsgeschwindigkeit des Nucleotids, was auch für den dTTP-aktivierten Umsatz im Vergleich zu GDP+dTTP gilt. Andererseits geht aus Abbildung 16

Abbildung 16

Lineweaver-Burk Diagramm des dTTP-aktivierten Umsatzes von Nucleotiden mit zwei exocyclischen Basensubstituenten



Bedingungen: 38 µg B_1, 0.2 mg B_2, 11.5 mM $MgCl_2$, 0.04 mM dTTP, pH 7.6, 25 °C

hervor, daß die Affinität des Enzymes, ersichtlich am scheinbaren K_m-Wert, für das GDP-Analoge wesentlich erhöht ist. Aus dem ebenfalls in Abbildung 16 dargestellten Verhalten der dTTP-aktivierten CDP-Reduktion ist zu vermuten, daß beide Substituenten für eine hohe Umsatzgeschwindigkeit des Nucleotids sorgen, obwohl die Affinität zum Enzym im Vergleich zu den beiden Purinnucleotiden herabgesetzt ist. Der größere scheinbare K_m-Wert der CDP+dTTP-Reduktion gibt für sich allein jedoch keinen weiteren Aufschluß, da erst eine ähnliche Serie für Pyrimidinnucleotide (wie hier für Purinnucleotide) Beziehungen zwischen Struktur und Enzymaffinität herstellen kann. In Tabelle 8

sind die kinetischen Daten der dTTP-aktivierten Substratumsätze zusammengefaßt. Der strukturabhängige Einfluß der Nucleobase auf V_{max} und scheinbaren K_m-Wert ist klar zu erkennen.

Tabelle 8
Kinetische Daten aus den dTTP-aktivierten Substratumsätzen unter Standardbedingungen

Nucleotid + dTTP	V_{max}	$K_{m(app.)}$	relative Reaktionsgeschwindigkeit
a^2ADP	2.65 nMole/min	3.6×10^{-5} M	56
a^2PuDP	3.22 " "	3.6×10^{-5} M	70
GDP	4.95 " "	5.4×10^{-5} M	100
BzDP	2.35 " "	6.9×10^{-5} M	48
ADP	1.55 " "	8.6×10^{-5} M	22
CDP	4.05 " "	1.0×10^{-4} M	82
IDP	3.68 " "	1.1×10^{-4} M	75
PuDP	2.2 " "	4.3×10^{-4} M	44

Bedingungen: siehe Abb. 14 - 16. Umrechnungsfaktor: nMole/min $\times 1.667 \times 10^{-2}$ = nkat

2.5.2.2. Modifizierte Nucleotide mit geringer oder ohne Substrateigenschaft

Wir haben wie auch bei dem L. leichmannii-Enzym modifizierte Nucleotide gefunden, die sehr schlechte oder keine Substrate der E. coli-Ribonucleotidreduktase sind, jedoch wichtigen Aufschluß über das aktive Zentrum des Enzymes geben. So wird im m_2^6ADP der hydrophobe Bereich des Nucleotids ausgedehnt und die Aminogruppe substituiert, andererseits wird das Nucleotid durch seine Methylsubstituenten sterisch anspruchsvoller. Die Frage, ob die E. coli-Ribonucleotidreduktase Nucleotide in der syn-Kon-

formation akzeptiert, wird durch br^8ADP beantwortet, während über negativ geladene Gruppen im aktiven Zentrum XDP Auskunft geben kann, da es bei pH 7.6 in der Nucleobase eine volle negative Ladung trägt. Die Effekte dieser Nucleotide sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9
Nucleosiddiphosphate von nur geringer oder ohne Substrateigenschaft

Substrat	Reduktion	Reduktion + Aktivator	Hemmung der CDP- oder GDP-Reduktion (K_i)
m_2^6ADP	0	0 (--)	$K_{i(app.)} = 1.6 \times 10^{-4}$ M
br^8ADP	0	0 (--)	$K_{i(app.)} = 1.6 \times 10^{-4}$ M
XDP^- pH 7.6	0	0 (--)	ja
XDP pH 6.4	0	0 (--)	ja [a]
fbzADP	0	0 (--)	sehr stark
s^6PuDP [b]	0	18 (dTTP) 14 (br^5dUTP) 14 (dGTP)	ja

[a] Es ist nicht zu entscheiden, ob die beobachtete Hemmung durch XDP^- oder XDP^o hervorgerufen wird, da beide Formen vorliegen.

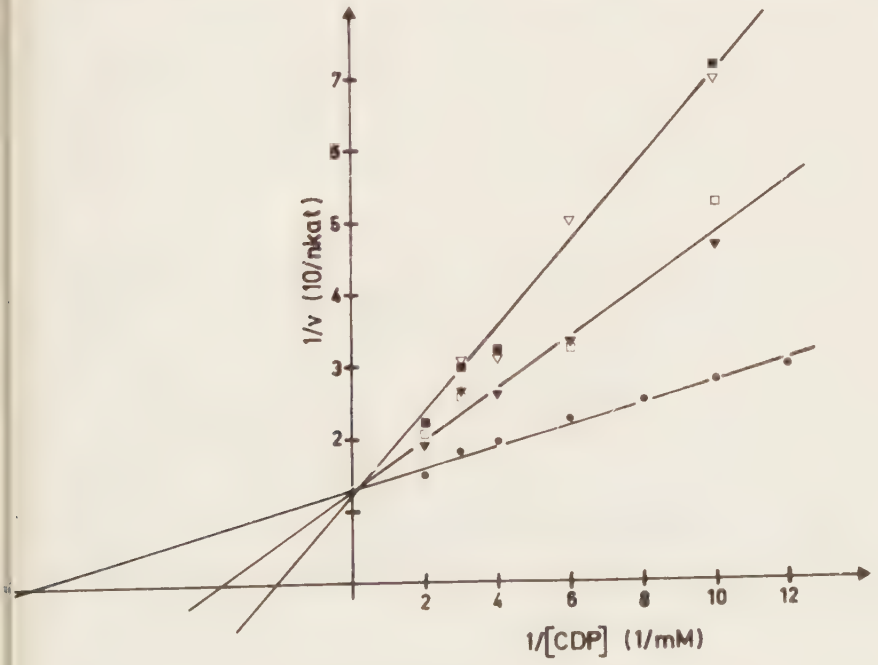
[b] Konzentration nur 0.1 mM. Zahlen des aktivierten Umsatzes auf 0.1 mM GDP+dTTP = 100 = 0.054 nkat bezogen.

Die Ergebnisse der Tabelle 9 konnten auch durch weitere Versuche belegt werden, die eine Isolation der erwarteten Endprodukte (Desoxyribonucleosidderivate) nach Inkubation mit größeren Enzymmengen über 24 Stunden zum Ziel hatten. Nach Abbau der Nucleosiddiphosphate mit alkalischer Phosphatase zu den Nucleosiden waren auf Kieselgel-Dünnschichtplatten in einem boathaltigen Laufmittel nach Reichard keine Hinweise auf entstandene Desoxyribonucleotide zu entdecken. Die mangelnden Substrateigenschaften von m_2^6ADP stehen im Einklang mit der Literatur, denn das Diphosphat des Nucleosid-Antibiotikums Sangivamycin mit ei-

nem Carboxamid-Substituenten an C-7 des 7-Deazapuringerüstes wird von der E. coli-Ribonucleotidreduktase nicht reduziert [45].

Wie die L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase setzt das Enzym aus E. coli Nucleotide in der syn-Konformation nicht um, was das Ausbleiben der Reduktion von br^8ADP bestätigt. Trotzdem ist br^8ADP wie m_2^6ADP in der Lage, die Reduktion eines Substrates zu hemmen (Abb. 17); beide Nucleotide hemmen offensichtlich unabhängig von der Struktur der Nucleobase im gleichen Ausmaß. Der kompetitive Hemmtyp spricht dafür, daß tatsächlich das aktive Zentrum betroffen ist.

Abbildung 17
Hemmung des dTTP-aktivierten CDP-Umsatzes durch m_2^6ADP und br^8ADP



■ 0.5 mM m_2^6ADP / CDP+dTTP, ▽ 0.5 mM br^8ADP / CDP+dTTP,
□ 0.25 mM m_2^6ADP / CDP+dTTP, ▼ 0.25 mM br^8ADP / CDP+dTTP,
● CDP+dTTP. Scheinbarer K_i-Wert: 1.6×10^{-4} M.
Bedingungen: 38 µg B_1, 0.2 mg B_2, 11.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM CDP, 0.04 mM dTTP, pH 7.6, 25 °C.

Die negative Ladung der Nucleobase im XDP bei pH 7.6 verhindert ebenfalls eine Reduktion, aber auch bei einem niedrigeren pH-Wert von 6.4 ist ein Umsatz nicht zu beobachten. Da unter diesen Bedingungen beide Formen XDP^{o} und XDP^{-} vorliegen, kann nicht entschieden werden, ob XDP^{o} kein Substrat ist, oder aber eine Hemmung des Enzymes durch XDP^{-} vorliegt.

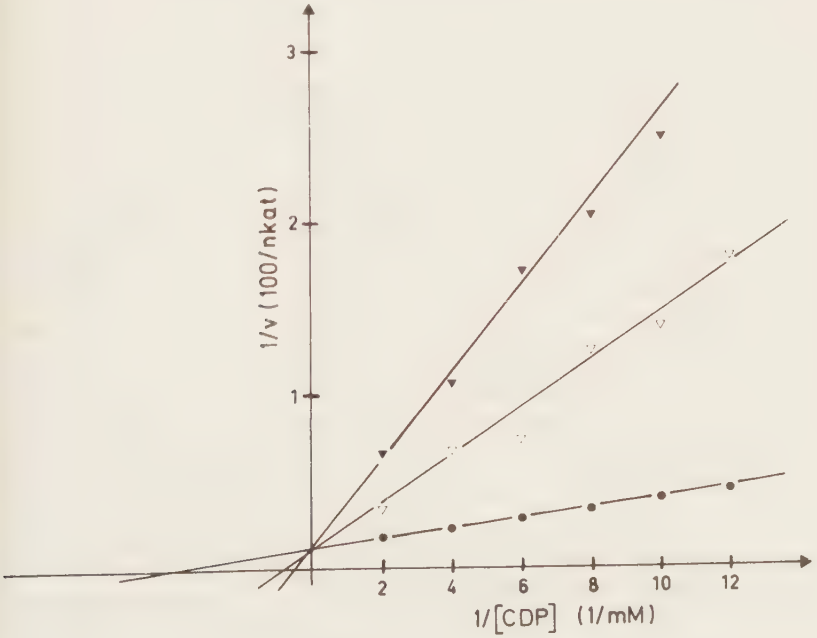
Die beiden letzten Analogen, 6-Thiopurinribosiddiphosphat ($s^{6}PuDP$) und N^{6}-(p-Fluorbenzoyl)-adenosindiphosphat stellen potentielle " affinity labels " dar, die mit dem Protein eine kovalente Bindung eingehen können. Da sie den Substraten sehr ähnlich aufgebaut sind, sollte eine solche Proteinmodifikation vorwiegend am aktiven Zentrum stattfinden. Eine entsprechende Wirkung ist für das $s^{6}PuTP$ (ATPase des Myosins [46]) und das fbzATP (Adenylat-Kinase [47]) beschrieben worden. Die E. coli-Ribonucleotidreduktase wird zwar stark durch fbzADP gehemmt (im Ausmaß mit araADP vergleichbar, siehe nächstes Kapitel), ein Anzeichen für eine kovalente Blockierung des aktiven Zentrums konnte jedoch nicht gefunden werden, da die Hemmung reversibel und durch Vorinkubation mit fbzADP nicht zu beeinflussen war.

Wie aus Tabelle 9 hervorgeht wird $s^{6}PuDP$ dagegen langsam von der E. coli-Ribonucleotidreduktase reduziert; für ein " affinity labeling " war kein Anzeichen zu erkennen. In Konzentrationen über 0.1 mM scheint das Nucleotid mit seiner Thio-Funktion irreversibel mit der Ribonucleotidreduktase zu reagieren, denn Protein fällt unter diesen Bedingungen aus. Die Empfindlichkeit der B_1-Untereinheit gegenüber einer Oxidation von Cystein-Aminosäureseitenresten ist bekannt. Dieser Effekt verhinderte eine weitere kinetische Untersuchung der Substrateigenschaften von $s^{6}PuDP$ und ein mögliches " affinity labeling " durch das Substrat.

2.5.2.3. Verhalten von Arabinonucleosiddiphosphaten

Da der Eingriff von Arabinonucleotiden in den Nucleinsäurestoffwechsel auf enzymatischer Ebene noch nicht befriedigend erklärt werden kann [30,49], sollten araCDP und araADP als mögliche Substrate der E. coli-Ribonucleotidreduktase geprüft werden. Beide Verbindungen werden im Standardtest nicht reduziert, sondern hemmen vielmehr den Substratumsatz eines anderen Nucleotids. Von araCDP benötigt man eine dreifach höhere Menge, um die Reduktion von CDP und GDP in ähnlichem Ausmaß wie durch araADP zu hemmen. Die Hemmung durch Arabinonucleotide ist im Gegensatz zu

Abbildung 18
Hemmung des dTTP-aktivierten CDP-Umsatzes durch araADP

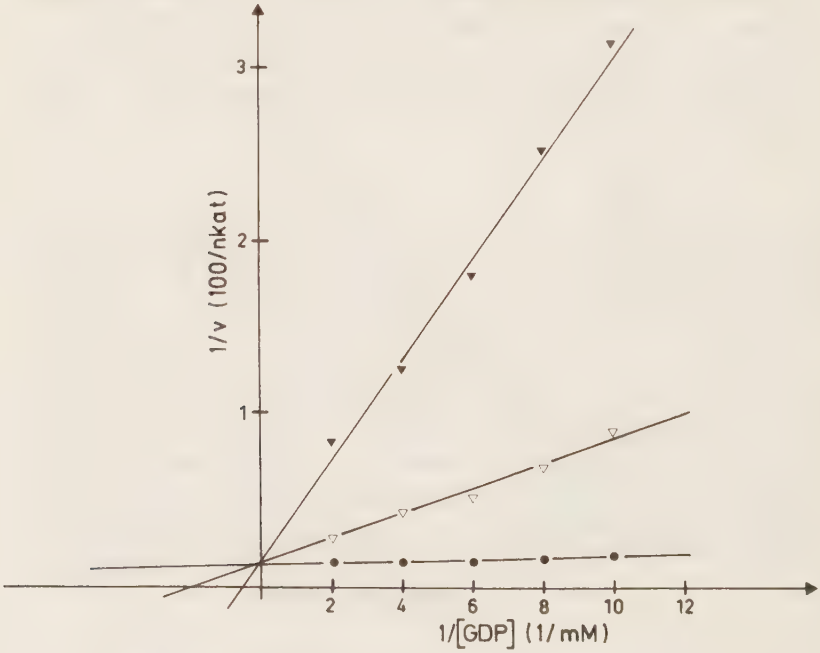


▼ 0.3 mM araADP / CDP+dTTP, ▽ 0.1 mM araADP / CDP+dTTP,
● CDP+dTTP. Scheinbarer K_i-Wert: 3.4×10^{-5} M.
Bedingungen: 38 µg B_1, 0.2 mg B_2, 11.5 mM $MgCl_2$, 0.04 mM dTTP, pH 7.6, 25 °C.

der durch m_2^6ADP bzw. br^8ADP bewirkten also auch von der Nucleobase abhängig. Eine quantitative Beschreibung der araCDP-Hemmung war allerdings nicht möglich, da bei den nötigen höheren araCDP-Konzentrationen eine Denaturierung von Protein eintrat.

Bei der Bestimmung der araADP-Hemmung war zu berücksichtigen, daß ADP auch an regulatorische Zentren bindet, wodurch nichtlineare Kinetiken erhalten werden [40]. Aus diesem Grunde haben wir die Kinetiken der araADP-Hemmung in Gegenwart des Aktivators dTTP aufgenommen. Die Abbildungen 18 und 19 beschreiben die Hemmung der aktivierten Substratumsätze von CDP und GDP; aus ihnen geht eindeutig die kompetitive Hemmung durch araADP hervor. Andererseits erkennt man, daß der aktivierte Umsatz

Abbildung 19
Hemmung des dTTP-aktivierten GDP-Umsatzes durch araADP



▼ 0.5 mM araADP / GDP+dTTP, ▽ 0.1 mM araADP / GDP+dTTP
● GDP+dTTP. Scheinbarer K_i-Wert: 1.0×10^{-5} M.
Bedingungen: Siehe Abbildung 18.

von CDP stärker von der araADP-Hemmung betroffen wird als die GDP+dTTP-Reduktion. Für den gleichen Effekt reicht bei der aktivierten CDP-Reduktion eine araADP-Konzentration von 0.3 mM aus, während für den stimulierten GDP-Umsatz eine araADP-Konzentration von 0.5 mM benötigt wird. Dieser Befund steht im Einklang mit den unterschiedlichen Affinitäten von GDP und CDP zum Enzym; GDP ($K_{m(app.)} = 5.4 \times 10^{-5}$ M) wird etwa doppelt so gut bei der dTTP-aktivierten Reduktion gebunden wie CDP. Ebenso fügt sich die Wirkung von araADP in die o.a. Beobachtungen ein, daß die nicht reduzierbaren ADP-Analogen m_2^6ADP und br^8ADP in kompetitiver Weise den Umsatz eines Substrates hemmen.

2.5.3. Wirkung von Desoxyribonucleosidtriphosphaten auf die Substratspezifität der E. coli-Ribonucleotidreduktase

Wie schon mehrfach erwähnt, werden Ribonucleotidreduktasen durch Desoxyribonucleosidtriphosphate als Effektoren in komplexer Weise reguliert. Auch für das Enzym aus E. coli ist eine Regulation durch die natürlichen Desoxyribonucleotide beschrieben und hinsichtlich ihrer physiologischen Signifikanz untersucht worden [40,43]. Eine Zusammenstellung der kinetisch bestimmten Reduktionsraten für mechanistische Interpretationen existiert dagegen in der Literatur nicht. Aus diesem Grunde haben wir mit dem spektrophotometrischen Standardtest die Reaktionsgeschwindigkeiten der natürlichen Substrate unter Einfluß der physiologisch vorkommenden Aktivatoren aufgenommen. Für weitergehende Aussagen sind die basenmodifizierten Substrate und ihre Aktivierung durch Desoxyribonucleotide in die Untersuchung mitaufgenommen worden, ebenso die Einflüsse einiger basenmodifizierter Desoxyribonucleosidtriphosphate wie dUTP, br^5dUTP, dITP und br^8dATP auf sämtliche Substrate der Ribonucleotidreduktase. Die Effekte sind in Tabelle 10 als relative Reaktionsgeschwindigkeiten, bezogen auf den dTTP-aktivierten GDP-Umsatz (100 = 0.08 nkat) zusammengestellt.

Tabelle 10

Relative Reaktionsgeschwindigkeiten von Substraten der E. coli-Ribonucleotidreduktase in Abwesenheit bzw. Gegenwart von Aktivatoren

Substrat	ohne	dTTP	br^{5}dUTP	dUTP	dCTP	dGTP	dITP	dATP	br^{8}dATP	
Konzentrat.:		0.04	0.1	0.1	0.5	0.1	0.1	1µM	0.1	(mM)
ADP	3	22	22	14	11	40	24	6	4	
a^{2}PuDP	33	70	79	67	79	44	14	33	33	
IDP	3	75	81	57	47	45	9	12	11	
GDP	25	100	100	90	74	65	27	25	43	
a^{2}ADP	11	56	48	56	32	38	11	11	18	
BzDP	10	48	54	43	47	31	10	10	28	
PuDP	2	44	18	17	7	6	5	4	7	
CDP	20	82	79	82	71	41	28	53	75	
UDP	6	42	28	28	55	11	6	31	56	

Die wichtigsten Substrat/Aktivator-Beziehungen sind durch Unterstreichen gekennzeichnet. Für die Desoxyribonucleotide sind die Konzentrationen angegeben, bei denen eine maximale Aktivierung erreicht wird (Ausnahme: dATP). Bedingungen: 38 µg B_1, 0.2 mg B_2, 11.5 mM $MgCl_2$, Substrat 0.5 mM, pH 7.6, 25 °C.

Aus Tabelle 10 geht eine durchweg hohe Aktivierung aller Substratumsätze durch dTTP und seine Analogen br^{5}dUTP und dTTP hervor. Die vergleichbaren aktivierenden Eigenschaften von dTTP und br^{5}dUTP bestätigen das bekanntlich sehr ähnliche Verhalten beider Nucleotide, lediglich dUTP stimuliert die Substratreduktion in geringerem Ausmaß. Obwohl dUTP eine Spezifität bezüglich des Substrates wie dTTP besitzt, wird das Fehlen der Methylgruppe bereits vom Enzym erkannt und verursacht eine geringere Stimulation. Der wohl wichtigere Hinweis für einen solchen Erkennungsprozeß stammt aus einem Vergleich der Konzentrationen,

bei denen die aktivierenden Effekte am stärksten ausgeprägt sind: dUTP entfaltet seine maximale Aktivierung erst in 2.5-fach höherer Konzentration als dTTP. Eine Zwischenstellung nimmt br^5dUTP ein, das eine weniger starke Konzentrationsabhängigkeit der maximalen Aktivierung zeigt: Substratumsätze, die einer ohnehin geringen Aktivierung unterliegen wie bei UDP, ADP, BzDP und PuDP werden schon in einer Konzentration von 0.04 mM br^5dUTP maximal stimuliert. Trotzdem sind Unterschiede zu dTTP vorhanden; br^5dUTP aktiviert die a^2PuDP- IDP- und BzDP-Reduktion leicht höher, in anderen Fällen aber deutlich geringer (PuDP, UDP) als dTTP.

Eine ähnlich hohe Aktivierung wie dTTP zeigt in einigen Fällen nur noch dCTP, alle anderen Desoxyribonucleotide besitzen eine geringere stimulierende Wirkung. Auch beim dCTP fällt der Unterschied zu dTTP am deutlichsten durch die mehr als zehnfach höhere Konzentration auf, die für eine maximale Stimulation benötigt wird. Von den restlichen Aktivatoren stimuliert lediglich dGTP in ähnlicher Weise wie die Pyrimidindesoxyribonucleotide, die Höhe der Aktivierung ist aber deutlich geringer. Die Ausnahme von diesen Verhalten besteht in der spezifischen Aktivierung des ADP-Umsatzes durch dGTP, der andererseits durch dTTP auch nur relativ schwach stimuliert wird. Eine besondere Beziehung zu ADP besitzt offensichtlich auch das dITP, das sonst keine nennenswerte stimulierende Wirkung mehr hat, es hemmt jedoch als einziges Desoxyribonucleotid einen Umsatz (a^2PuDP), was wichtig für die mechanistische Interpretation der Umsatzaktivierung ist.

Die letzten beiden Desoxyribonucleotide dATP und sein Bromderivat br^8dATP sollten eine Sonderstellung einnehmen, da dATP in Konzentrationen von 0.1 mM die Ribonucleotidreduktion zum Erliegen bringt und nur im mikromolaren Bereich aktivierend wirkt. Tabelle 10 bestätigt beiden Nucleotiden ähnliche aktivierende Eigenschaften, jedoch wirkt br^8dATP in Konzentrationen von 0.1 mM aktivierend und erst in höheren Konzentrationen hemmend. Im Falle des br^8dATP scheint eine Abtrennung der hemmenden von der aktivierenden Wirkung des dATP gelungen zu sein, denn unter den hier beschriebenen Bedingungen ist nur eine stimulierende Eigenschaft des br^8dATP zu beobachten.

2.5.4. Einfluß von Nucleosidtriphosphaten auf die Substratreduktion der E. coli-Ribonucleotidreduktase

Schließlich wird neben der Aktivierung durch Desoxyribonucleotide bei der E. coli-Ribonucleotidreduktase die Reduktion der Pyrimidinnucleotide in gleichem Ausnaß durch ATP beschleunigt. In Tabelle 11 sind eine Reihe von ATP-Analogen zusammengestellt, deren Einfluß auf die Umsatzsteigerung von radioaktiv markiertem Substrat ((5-^{3}H)CDP bzw. (5 -^{3}H)UDP) getestet wurde. Der andersartige Enzymtest bietet sich hier an, da auf diese Weise eine größere Zahl von Bestimmungen in einer Serie durchzuführen war, wodurch die einzelnen Verhaltensweisen der Nucleotide absolut untereinander vergleichbar sind. Zum anderen wird in der Literatur diese Bestimmung als Standardtest benutzt [33], sodaß die Untersuchung von Aktivatoreigenschaften einiger ATP-Analogen mit diesen Test einen weiteren Vergleich zur Literatur zuläßt. Die Ribonucleotidreduktion verläuft unter diesen Bedingungen über 30 Minuten linear mit der Inkubationsdauer.

Tabelle 11
Wirkung von ATP-Analogen auf die Pyrimidinribonucleotidreduktion

Nucleotid	CDP-Reduktion	UDP-Reduktion
ohne	0.7 nMole/10 min	0.15 nMole/20 min
ATP	4.5 " "	1.3 " "
br^{8}ATP	2.4 " "	0.24 " "
a^{2}ATP	3.6 " "	0.88 " "
s^{6}PuTP	1.1 " "	nicht bestimmt
a^{2}PuTP	0.1 " "	" "
PuTP	0.9 " "	0.1 nMole/20 min
m$^{6}_{2}$ATP	0.7 " "	0.1 " "
araATP	0.1 " "	nicht bestimmt
fbzATP	1.6 " "	" "
fbzATP [a]	2.75 " "	" "

[a] 15 Minuten mit 1 mM fbzATP ohne Substrat bei 25 °C vorinkubiert.
Bedingungen: 15 µg B_1, 80 µg B_2, 11.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM Substrat, ATP und Analoge 1 mM, 10 mM DTT, pH 7.6, 25 °C.

Aus der Tabelle 11 ist zu entnehmen, daß für die ATP-Wirkung die Anwesenheit der 6-Aminogruppe essentiell ist, denn Nucleotide wie PuTP und a^2PuTP aktivieren nicht. Eine Ausnahme bildet das araATP, das aber auf Grund seiner veränderten Zuckerstruktur ein abweichendes Verhalten zeigt (siehe S. 52). Berücksichtigt man die leicht stimulierenden Effekte von s^6PuTP (Gleichgewicht zwischen =S-und -SH-Form) und fbzATP und vergleicht sie mit dem wirkungslosen m_2^6ATP, kann man obige Aussage verallgemeinern und feststellen, daß in der 6-Position zur Aktivierung der Pyrimidinnucleotidreduktion eine Wasserstoffbrücken-Donorfunktion vorhanden sein muß.

Da die Aktivierung der CDP- bzw. UDP-Reduktion durch ATP wie bei den Desoxyribonucleotiden über die high-sites der B_1-Untereinheit vermittelt wird, lag es nahe zu prüfen, ob nicht auch die anderen Ribonucleotide eine Aktivierung bewirken können. Die Literatur beschreibt nur eine stimulierende Wirkung von UTP auf die GDP-Reduktion, alle anderen Ribonucleotide sollen keine Aktivierung ausüben [40]. Die Überprüfung dieser Ergebnisse ergab sehr wohl eine Stimulation der natürlichen Substrate durch Ribonucleosidtriphosphate, deren Effekte in Tabelle 12 zusammengefaßt sind.

Tabelle 12
Aktivierung der E. coli-Ribonucleotidreduktase durch Nucleosidtriphosphate

Substrat	ohne	ATP	GTP	CTP	araCTP	UTP	XTP	ITP
ADP	3	3	36	42	3	6	3	4
GDP	25	48	46	54	39	48	30	25
CDP	20	74	47	50	50	44	27	10
UDP	6	20	47	44	35	23	7	6

Die wichtigsten Substrat/Aktivator-Beziehungen sind durch Unterstreichen gekennzeichnet.

Bedingungen: 38 µg B_1. 0,2 mg B_2, 11.5 mM $MgCl_2$, Substrat 0.5 mM Nucleosidtriphosphate 1 mM, pH 7.6, 25 °C.

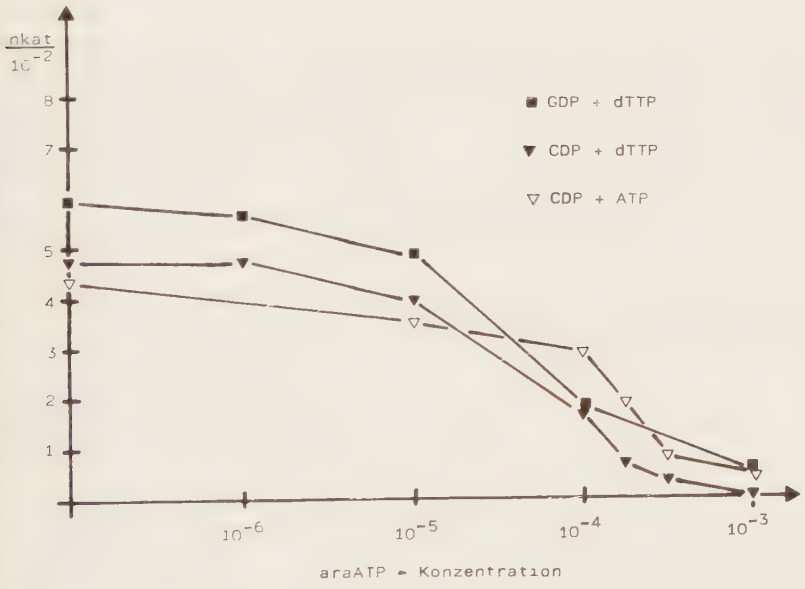
Es fallen die deutlich aktivierenden Eigenschaften aller natürlichen Ribonucleotide auf, die in der Größenordnung eines Aktivators wie dGTP liegen. Die Aktivator/Substrat-Spezifitäten entsprechen häufig denen der analogen Desoxyribonucleotide, andererseits bestehen neue Beziehungen wie die Wirkung von CTP auf den ADP- und GTP auf den UTP-Umsatz. Zu betonen ist die Stimulierung der GDP-Reduktion durch ATP, die Bedeutung dieses Effektes wird später (Kap. 3.5.2.1.) diskutiert.

Überraschend ist die aktivierende Wirkung von araCTP, das abgeschwächt und im Falle der CDP-Reduktion vergleichbare Effekte wie CTP zeigt. Bezeichnenderweise kann trotz dieser Parallelität der Spezifitäten araCTP wie dCTP nicht den Umsatz von ADP stimulieren, was einen Beitrag des Zuckers zur Spezifität der Aktivierung dokumentiert. Diese aktivierende Wirkung des araCTP überrascht deshalb, da Arabinonucleotide - wie oben gezeigt - die Ribonucleotidreduktion hemmen, wenn auch Arabinoncytosinnucleotide schwächer als Arabinoadeninnucleotide wirksam sind. In Übereinstimmung hiermit verhält sich araATP eindeutig als Inhibitor der E. coli-Ribonucleotidreduktase, was in Abbildung 20 dargestellt ist.

Im Gegensatz zur araCTP-Wirkung kommt bei einer araATP-Konzentration von 1 mM die Substratreduktion zum Erliegen. Diese araATP-Hemmung resultiert nicht aus einer Magnesiumionenkomplexierung (wie für eine leichte Hemmung durch hohe ATP-Konzentrationen berichtet [41]), denn Austausch des Magnesiumchlorids gegen Natriumacetat läßt die Hemmung durch araATP unangetastet.

Wie schon für die Substratbindungsstelle beschrieben, haben wir versucht, mit dem N^6-(p-Fluorbenzoyl)-adenosintriphosphat einen " affinity label " in die regulatorischen Zentren der Ribonucleotidreduktase einzubringen. Aus Tabelle 11 geht hervor, daß eine 15-minütige Vorinkubation die ATP-ähnliche Wirkung von 40% des ATP-Effektes (ohne Vorinkubation) auf 70% des ATP-Effektes steigern kann. Dieser Befund wurde auch durch den spektrophotometrischen Test bestätigt. Da aber die Enzymhemmung durch dATP und die Konkurrenz von ATP und dTTP um die regulatorischen Zen-

Abbildung 20
Konzentrationsabhangige Hemmung der Ribonucleotidreduktase aus E. coli durch araATP



Bedingungen: 38 µg B_1, 0.2 mg B_2, 11.5 mM $MgCl_2$, Substrat 0.5 mM dTTP 0.04 mM, pH 7.6, 25 °C.

tren auch durch die Vorinkubation unverändert bestehen bleiben, liegt kein Hinweis darauf vor, daß eine kovalente Bindung zum Enzym gebildet worden ist.

Ebenso liegen keinerlei Anzeichen dafür vor, daß das 6-Thiopurinribonucleosidtriphosphat eine kovalente Bindung mit dem Enzym eingeht. Vorinkubation mit s^6PuTP ergab im Vergleich mit der direkten Konkurrenz keine Verringerung der ATP-Wirkung auf die CDP-Reduktion: s^6PuTP verhält sich vielmehr wie ein schwacher, dem ATP analoger Aktivator.

3. Diskussion

3.1. Modellvorstellungen zur Beschreibung alloster geregelter Enzyme

Bevor die vorgestellten Ergebnisse diskutiert werden, ist es angebracht, einige grundlegende Eigenschaften von alloster geregelten Enzymen zu behandeln. Sie stehen oft am Anfang einer Reaktionssequenz und werden wie im Fall der Aspartat-Transcarbamylase von Endprodukten der Reaktionsfolge " feed-back " reguliert. In der Regel zeigen solche Enzyme einen komplexen Aufbau, bei dem mehrere Untereinheiten zur vollen Aktivität benötigt werden. Im Falle der Aspartat-Transcarbamylase aus E. coli ist das Enzym aus zwei katalytischen Trimeren und drei regulatorischen Dimeren aufgebaut [3], sodaß es nicht verwundert, daß die Kinetiken des Holoenzyms vom Normalverhalten abweichen. So zeigt beispielsweise der Verlauf der Enzym-Substrat-Sättigungskurve statt der hyperbolen eine sigmoide Form, d.h. unter Einfluß eines Effektors werden weitere Substratmoleküle an das Enzymoligomer besser und stärker gebunden. Eine solche kooperative Substratbindung an Enzymuntereinheiten, die sich auch negativ (eine Substratbindung hemmend) äußern kann [63], ist grundlegend mit dem allosteren Verhalten von Enzymen verknüpft. Kinetische Beschreibungen solcher Enzyme müssen die kooperativen Verhaltensweisen erklären können. Bisher existieren zwei allgemein anerkannte Modellvorstellungen, die allostere Regulation und kooperative Effekte von Enzymen beschreiben.

Das Modell von Monod, Changeux und Wyman [64] geht von der Annahme aus, daß die Symmetrie als treibende Kraft in der Wechselwirkung von Proteinuntereinheiten dafür sorgt, daß alle Untereinheiten in derselben Konformation vorliegen. Als Konsequenz treten Änderungen der Konformation simultan für alle Untereinheiten ein. Es werden mindestens zwei Zustände des Proteinoligomers gefordert: Die R-Konformation, die eine höhere Affinität zum Substrat und allosteren Aktivator besitzt und die T-Konformation mit höherer Affinität zu allosteren Inhibitoren. Die Zugabe von einem Partner, der bevorzugt an T oder R bindet,

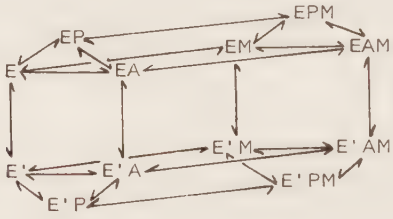
verschiebt somit das Gleichgewicht zwischen beiden Proteinzuständen. Da alle Konformationsänderungen gleichzeitig ablaufen, beobachtet man kooperatives Verhalten.

Das Modell von Koshland, Nemethy und Filmer [65] sagt keine besondere Konformation der Proteinuntereinheiten voraus. Erst durch die Bindung eines Liganden (Substrat, Aktivator, Inhibitor) wird die Konformation dieser Untereinheit verändert und gibt diese Umorientierung an andere Untereinheiten weiter. Die Symmetrieänderungen werden durch das eintretende Molekül verursacht; Zustände, die das Molekül bevorzugt binden, werden nicht gefordert.

Diese für viele alloster geregelten Enzyme zutreffenden Vorstellungen sind nicht auf die beiden hier behandelten Ribonucleotidreduktasen übertragbar. Wenn überhaupt, könnten sie nur für das aus Untereinheiten aufgebaute Enzym aus E. coli zutreffen, doch hat man selbst hier keine sigmoidalen Substratabhängigkeiten noch kooperative Effekte gefunden. Da sämtliche Nucleotide an die B_1-Untereinheit der E. coli-Ribonucleotidreduktase binden, ist vielmehr eine Parallelität zur monomeren Ribonucleotidreduktase aus L. leichmannii zu ersehen, und man muß sich fragen, ob die Bezeichnung der Ribonucleotidreduktasen als alloster geregelte Enzyme überhaupt zutrifft.

Definiert man allostere Enzymregulation lediglich als die Eigenschaft eines Liganden, durch Anlagerung an eine von dem aktiven Zentrum räumlich verschiedene Bindungsstelle auf den Substratumsatz Einfluß zu nehmen, so trifft die Bezeichnung der Ribonucleotidreduktasen als alloster geregelte Enzyme zu. Neben der fehlenden sigmoidalen Substratsättigungskurve sind viele andere Bedingungen erfüllt; beispielsweise weichen Lineweaver-Burk-Auftragungen vom Linearverhalten ab, was durch sättigende Konzentrationen der restlichen Reaktionspartner oft beseitigt werden kann. Es ist in letzter Zeit mehrfach begründet worden, daß nichtlineare Kinetiken auch bei monomeren Enzymen auftreten können. Zur Diskussion des Reaktionsmechanismus von Ribonucleasen sind solche theoretischen Überlegungen mit Erfolg herange-

zogen worden [66]. Die zu beobachtenden (negativ) kooperativen Effekte werden dabei auf langsame Übergänge einer Enzymspezies (E) in eine andere (E') zurückgeführt. Für den Fall der Ribonucleotidreduktasen, bei denen Umwandlungen der Enzymspezies durch Effektoren ausgelöst werden, gibt die allgemeine Beschreibung für ein Substrat (A) und einen Effektor (M) nach der Theorie folgende Zusammenhänge [67]:



(P = Produkt)

Diese vielfältigen Beziehungen der Enzymzustände für nur ein Substrat und einen Effektor lassen erkennen, welche Schwierigkeiten bei einer kinetischen Beschreibung der Ribonucleotidreduktase auftreten müssen, zumal dieses Modell zusätzliche Einflüsse von Substrat und Coenzym auf die Enzymspezies noch vernachlässigt.

Als Grundlage für unsere Untersuchungen haben wir sättigende Konzentrationen aller Reaktionspartner bis auf den zu untersuchenden gewählt, da unter diesen Bedingungen i.a. lineare Kinetiken (hyperbole Enzym-Substrat-Sättigungskurven) zu erhalten sind. Alle im folgenden diskutierten Zusammenhänge gelten mit der Einschränkung, daß sich aus kinetischen Daten allein kein Mechanismus beweisen läßt. Mit der in dieser Arbeit gesammelten Kenntnis vieler Strukturabhängigkeiten der Substrat-Enzym-Effektor-Wechselwirkungen ist es aber möglich, bestimmte molekulare Zustände zu postulieren, die nach Absicherung durch unabhängige Methoden einmal als Grundlage für eine vollständigere Beschreibung des Ribonucleotidreduktase-Mechanismus dienen

können. Andere Zugänge zur Beschreibung dieser Wechselwirkungen wie Gleichgewichtsdialyse gegen Liganden oder aber Röntgenstrukturdaten des Proteins müssen berücksichtigen, daß das Fehlen nur eines Reaktionspartners die aktive Enzymspezies schon so verändern kann, daß die Aussagen dieser Technik allein auch nicht den Beweis für die Struktur oder für den Mechanismus geben können. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, müßte man eine Gleichgewichtsdialyse während der Ribonucleotidreduktion durchführen oder aber einen Kristall des reduktionsfähigen Enzyms herstellen. Solche Bedingungen sind nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand nicht einzuhalten und werden in der folgenden Diskussion nicht weiter berücksichtigt.

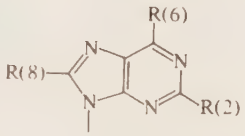
3.2. Spezifität der Lactobacillus leichmannii-Ribonucleotidreduktase für Nucleotide

3.2.1. Substrat-Spezifität

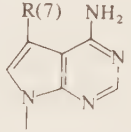
Für die Ribonucleotidreduktase aus L. leichmannii sind als essentielle Substratstrukturen die Triphosphatgruppierung und die Ribose bestimmt worden [19,29], eine Änderung der Basenstruktur läßt aber eine Reduktion noch zu. In Tabelle 13 sind alle Purinnucleosid-5'-triphosphate zusammengestellt, die bisher in ihrer Wechselwirkung mit der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase untersucht worden sind. Aus Tabelle 13 ist ersichtlich, daß die Substratreduktion von dem Substituenten der Purinbase bestimmt wird. Polare Substituenten wie Amino- oder Carbonylfunktionen (I - IV, VIII) vermitteln gute Substrateigenschaften, während eine Entfernung (VII, XII) und weitere Substitution dieser Gruppen (V) oder des Fünfringes (VI, IX - XI) die Reduktionsgeschwindigkeit verlangsamen. Dabei fällt auf, daß die relativ geringen Strukturänderungen im 8-Bromadenosin- und Formycintriphosphat (VI, XI) einen totalen Verlust der Substrateigenschaften zur Folge haben. Das liegt in dem dreidimensionalen Aufbau der beiden Nucleotide begründet, da Veränderungen in der 8-Position eine Drehung der Base um die N-Glykosidbindung zur

Tabelle 13 Relative Reduktionsgeschwindigkeiten von Purinribonucleotiden mit der Ribonucleotidreduktase aus L. leichmannii: Strukturabhängigkeit und Aktivatorbeziehungen

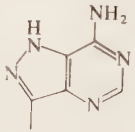
Basenstrukturen:



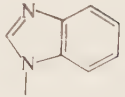
I–VII



VIII–X



XI



XII

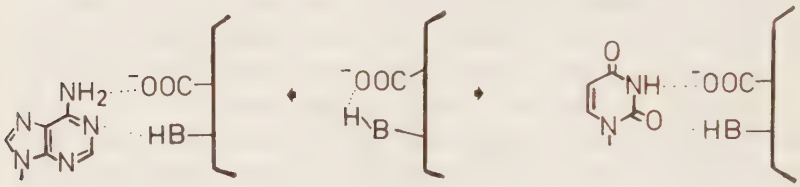
	Triphosphat von	R(2)	R(6)	R(7)	R(8)	Reaktionsgeschwindigkeit - Aktivator	Reaktionsgeschwindigkeit + Aktivator	Aktivator-nucleotid	Literatur
I	Guanosin	NH_2	=O		H	100		-	18
II	Inosin	H	=O		H	6	38	dTTP	18
III	Xanthosin (neutral)	=O	=O		H	16	36	dTTP	
IV	Adenosin	H	NH_2		H	20	103	dGTP	18
V	N^6-Dimethyladenosin	H	$N(CH_3)_2$		H	0.1	5	dGTP	
VI	8-Bromadenosin	H	NH_2		Br	0	0	-	
VII	Purinribosid	H	H		H	0.1	19	dGTP	
VIII	Tubercidin			H		35	75	dGTP	31
IX	Toyocamycin			CN		1	50	dGTP	31
X	Sangivamycin			$CONH_2$		1	8	dGTP	31
XI	Formycin					0	0	-	31
XII	Benzimidazolribosid					0.1	2	dGTP	19

Folge haben. Dieses Phänomen wird in Kapitel 3.4. zusammenhängend diskutiert.

Um den Einfluß von Substituenten auf die Substrateigenschaften zu beurteilen, kann man das Substratverhalten des unsubstituierten Purinnucleotids als Bezugspunkt betrachten. Ein Vergleich mit dem BzTP gibt zusätzliche Anhaltspunkte dafür, ob das aktive Zentrum einen polaren oder hydrophoben Charakter besitzt. Insgesamt werden die unpolaren Substrate (V, VIII, XII) langsamer umgesetzt als beispielsweise ATP, sodaß ein polarer Charakter des aktiven Zentrums naheliegt. Diese Schlußfolgerung wird zusätzlich durch die ungewöhnliche pH-Abhängigkeit der XTP-Reduktion bestätigt, die eine höhere Reduktion von XTP bei niedrigerem pH-Wert erkennen läßt. Da alle anderen Substrate bei niedrigem pH-Wert langsamer reduziert werden, haben wir auf einen Umsatz der bei sinkendem pH-Wert im Gleichgewicht auftauchenden XTP°-Form geschlossen. XTP^{-} wird offensichtlich durch einen anionischen Glutamin- oder Asparaginsäurerest im aktiven Zentrum abgestoßen, der gegenüber der Nucleobase des Substrates liegt. Dieser anionische Säurerest fixiert andererseits als Akzeptor die Substrate mit Substituenten wie $-NH_2$ oder -NH- durch Wasserstoffbrückenbildung. Eine genauere Analyse der Tabelle 13 läßt uns die zusätzliche Anwesenheit eines Wasserstoffdonors (z.B. ein protoniertes Histidin) postulieren, das im Zusammenwirken mit dem Asparagin-oder Glutaminsäurerest für eine Fixierung der Nucleobasen über =O oder =N- verantwortlich ist.

Die Anwesenheit eines Aktivators erhöht nach diesen Vorstellungen nicht die eigentliche Reduktion, indem der Katalyseschritt beschleunigt wird, sondern sorgt für eine bessere Bindung der Nucleobase des Substrates durch die beiden Aminosäurereste. Je nach Struktur der Base wird sie auf diese Weise unterschiedlich stark gebunden, woraus sich die verschiedenen Reduktionsgeschwindigkeiten ableiten. Diese hypothetische Situation entspricht der bevorzugten Fixierung eines 3'-Guanylsäure-Moleküls durch einen Glutamat- und einen Histidinrest im aktiven Zentrum der Ribonuclease T_1; dieses Enzym ist jedoch wesentlich

einfacher aufgebaut und nicht alloster geregelt [68]. Die möglichen Wechselwirkungen von Substrat und Aminosäureresten im aktiven Zentrum der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase sind in dem folgenden Schema zusammengefaßt.



3.2.2. Wirkung von allosteren Aktivatoren

Aus dem unterschiedlichen Verhalten von Nucleotiden im Tritiumaustausch und bei der Substrataktivierung haben Follmann und Hogenkamp [19] auf zwei regulatorische Zentren bei der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase geschlossen. Eines ist für die Bindung des Coenzym B_{12} und den Tritiumaustausch verantwortlich, während das zweite die Substratbindungsstelle beeinflusst. Andererseits fand man bei Gleichgewichtsdialyse des Proteins gegen Nucleotide nur eine regulatorische Bindungsstelle. Die weiter oben beschriebenen Vorstellungen über monomere Enzyme zeigen an, daß diese beiden Aussagen nicht widersprüchlich sein müssen. Vielmehr kommt es darauf an, welche Form des Enzyms man untersucht: Die Enzymformen in beiden Untersuchungsmethoden sind nicht identisch, da bei der Gleichgewichtsdialyse des Proteins kein Coenzym zugegen und auch keine Substratbindung nachzuweisen war. Nur bei zusätzlicher Anwesenheit des Coenzyms wie im Tritiumaustausch kann auch die Substratbindungsstelle besetzt werden. Das geht aus dem erheblich höheren Tritiumaustausch von XTP+dTTP gegenüber den Einzelkomponenten hervor, den man nur

durch eine Optimierung der Effektorbindung von der Substratseite her erklären kann.

Wir haben mit unseren Experimenten die Existenz zweier Regulatorbindungsstellen weiter erhärten können. Die Desoxyribonucleotide br^8dATP und dXTP stimulieren zwar den Substratumsatz, katalysieren aber keinen signifikanten Tritiumaustausch. Andererseits ist XTP^- zum Tritiumaustausch in der Lage, sodaß die fehlende Wirkung des dXTP nicht allein auf seiner zusätzlich geladenen Base beruhen kann. Für die Stimulation des Substratumsatzes ist wohl $dXTP^0$ die aktive Spezies, da eine pH- und Konzentrationsabhängigkeit der Aktivierung vorliegen. Speziell für die regulatorische Bindungsstelle, mit deren Besetzung der Tritiumaustausch einhergeht, gilt nicht die strikte Ablehnung der XTP^--Spezies, da hier die pH-Abhängigkeiten des Austausches von ATP und XTP einander gleichgerichtet sind. Obwohl aus diesen Unterschieden nur indirekt zwei regulatorische Zentren abzuleiten sind, erscheint es uns als schwierig, wenn nicht unmöglich, alle diese und früher gefundenen Effekte mit nur einer Bindungsstelle zu erklären.

Die beiden anderen untersuchten Desoxyribonucleotide dUTP und dITP katalysieren einen Tritiumaustausch [26] und aktivieren den Substratumsatz. Das dUTP folgt in seiner Spezifität ganz dem dTTP, die fehlende Methylgruppe ist für die Erkennung des dUTP vom Enzym ohne Bedeutung. Die Erkennung des dTTP beruht demnach in erster Linie auf den Carbonylsubstituenten und dem Pyrimidingrundgerüst. Dagegen entspricht dITP nur in der ATP-Stimulation dem dGTP, sonst zeigt es eher leicht hemmende Effekte. Die aktivierende Wirkung des br^8dATP ist unerwartet, da br^8ATP nicht nur kein Substrat ist, sondern auch keinerlei Effekt auf die CTP-Reduktion ausübt. Die Spezifität des br^8dATP entspricht für die Aktivierung der CTP-Reduktion zwar dem dATP, aber die leichte Stimulation des ITP-Umsatzes und eine fehlende Hemmung der ATP-Reduktion (wie für dATP) belegen eine unterschiedliche Erkennung von dATP und br^8dATP durch das Enzym.

Mit Hilfe aller Nucleotid-Analogen können wir für die L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase zeigen, daß außer den spezifischen Substrat- und Aktivatorbeziehungen (CTP/dATP, ATP/dGTP, UTP/dCTP) viele weitere Wechselwirkungen vorhanden sind, die von starker Aktivierung (CTP/br^{8}dATP) bis zur leichten Hemmung (UTP/dITP) reichen:

Tabelle 14
Wirkungen von Desoxyribonucleotiden auf den Substratumsatz

Substrat	Aktivierung		Kein oder geringer Effekt	Hemmung
ATP	dGTP	dITP, dXTP	br^{8}dATP	dATP, dCTP
CTP	dATP	br^{8}dATP, dXTP	dGTP, dTTP	dCTP, dITP
UTP	dCTP	dGTP, dTTP	dATP, br^{8}dATP	dXTP, dITP
ITP	dTTP	br^{8}dATP, dXTP	dCTP, dATP	dITP, dGTP

Aus dem Schema geht hervor, daß die leichte Hemmung für ATP durch dATP, CTP durch dCTP nicht als kompetitiv um das aktive Zentrum (Produkthemmung) verstanden werden muß, sondern als eine allostere Einflußnahme von den regulatorischen Zentren aus. Die dem Substrat entsprechenden Desoxyribonucleotidprodukte hemmen offensichtlich die Reduktion ihres analogen Ribonucleotids durch eine sich ungünstig auswirkende Konformationsänderung des Proteins. Daß es sich wirklich um eine der möglichen allosteren Wechselbeziehungen handelt, sieht man an der ausbleibenden Hemmung des UTP-Umsatzes durch dUTP und dTTP, die sogar eine leichte Aktivierung ausüben. Eine kompetitive Produkthemmung als Ursache dieser Effekte müßte sonst auch bei der UTP-Reduktion vorhanden sein.

Bei der Beschreibung der allosteren Wechselwirkungen darf nicht übersehen werden, daß bei Abwesenheit eines Aktivators und genügend hoher Substratkonzentration über die regulatorischen Zentren eine Eigenaktivierung durch das Ribonucleotid stattfindet.

In der Literatur hat man aus den nichtlinearen Lineweaver-Burk-Diagrammen auf einen solchen Mechanismus geschlossen [18]. Die vorgestellten Enzymmodelle, die Umwandlungen der Enzymspezies zulassen, sagen ein solches Verhalten voraus. Schwieriger wird ein Verständnis auf dieser Basis für ATP/dATP und CTP/dCTP, da diese Kombinationen langsamer als Substrat allein in der Ribonucleotidreduktion sind. Wie später bei der Besprechung der E. coli-Ribonucleotidreduktase gezeigt wird, spielt neben der Nucleobase jedoch auch der Zucker eine spezifitätssteuernde Rolle. In der Regel betrifft er gerade die Höhe der Beeinflussung: Desoxyribonucleotide aktivieren stärker als Ribonucleotide, während Arabinonucleotide hemmen.

Die hier für das Enzym aus L. leichmannii vorgestellten Ergebnisse belegen, daß die spezifischen Wechselwirkungen von Substrat und Aktivator über das Protein hinweg überwiegend von den Nucleobasen gesteuert sind. Die zu beobachtenden Effekte zeigen eine graduelle Abstufung von starker Aktivierung bis zu leichter Hemmung. Ein solches Verhalten kann nur von einem sehr flexiblen Protein ausgeübt werden, das sich dem jeweiligen Liganden anpaßt. Unsere Vorstellungen von einem derartigen " two-sided induced fit ", die auch Gegenstand einer ausführlichen Veröffentlichung sind [69], werden unten im Zusammenhang mit dem E. coli-Enzym besprochen (siehe 3.5.2.).

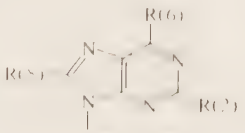
3.3.Eigenschaften der Escherichia coli-Ribonucleotidreduktase

3.3.1. Substrat-Spezifität

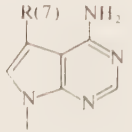
Wie bei der Vorstellung der E. coli-Ribonucleotidreduktase beschrieben (siehe 1.3.), ändern Modifikationen im Phosphatrest oder der Ribose die Substrateigenschaften eines Nucleotids so drastisch, daß nur die Nucleobase als Ursache für feinere Unterschiede der Reaktionsgeschwindigkeiten in Frage kommt. Neben einem Einfluß des Grundskeletts (Purin oder Pyrimidin) der Nucleobase machen wir vor allem die exocyclischen Basensubstitu-

Tabelle 15 Relative Reduktionsgeschwindigkeiten von Purinribonucleotiden mit der Ribonucleotid-reduktase aus E. coli : Strukturabhängigkeit und Aktivatorbeziehungen

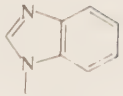
Basenstrukturen:



I - XI



XII - XIV



XV

	Diphosphat von	R(2)	R(6)	R(7)	R(8)	Reaktionsgeschwindigkeit - Aktivator	Reaktionsgeschwindigkeit + Aktivator	Aktivator-nucleotid	Literatur
I	Guanosin	NH_2	=O		H	25	100	dTTP	40
II	2-Aminoadenosin	NH_2	NH_2		H	11	56	dTTP	
III	Xanthosin	=O	=O		H	0	0	-	
IV	Adenosin	H	NH_2		H	3	40	dGTP	40
V	2-Aminopurinribosid	NH_2	H		H	33	70	dTTP	
VI	Inosin	H	=O		H	3	75	dTTP	
VII	N^6-Dimethyladenosin	H	$N(CH_3)_2$		H	0	0	-	
VIII	8-Bromadenosin	H	NH_2		Br	0	0	-	
IX	N^6-(p-Fluorbenzoyl)adenosin	H	HNCO-C6H4-F		H	0	0	-	
X	6-Thiopurinribosid	H	=S		H	0	18	dTTP	
XI	Purinribosid	H	H		H	2	44	dTTP	
XII	Tubercidin			H			14	dGTP	45
XIII	Toyocamycin			CN			1	dGTP	45
XIV	Sangivamycin			$CONH_2$		0	0	-	45
XV	Benzimidazolribosid					10	48	dTTP	

enten für die verschiedenen Reaktionsgeschwindigkeiten verantwortlich. Eine Reihe von Purinnucleosiddiphosphaten haben wir unter diesem Aspekt untersucht; ihr Verhalten ist in Tabelle 15 mit einigen bereits früher untersuchten Nucleotiden zusammengefaßt.

Eindeutig ist aus Tabelle 15 die Spezifität der E. coli-Ribonucleotidreduktase für die anti-Konformation der Nucleotide zu entnehmen, da br^8ADP (VIII) kein Substrat des Enzymes ist. Substituenten an der 6-Aminogruppe wie im m_2^6ADP (VII) oder fbzADP (IX) verhindern eine Reduktion, obwohl eine Bindung an das aktive Zentrum stattfindet, wie die kompetitive Hemmung der CDP-Reduktion durch m_2^6ADP und br^8ADP bestätigt (siehe Abb. 17). Die Struktur dieser Basen muß zu solchen Umformungen des aktiven Zentrums führen, daß eine Reduktion erschwert bzw. unmöglich wird. Solche Vorgänge bestimmen wohl auch die Wechselwirkung des Enzyms mit XDP (III). Obwohl hier keine räumlich außergewöhnliche Struktur der Base vorhanden ist, scheint die in der Base negativ geladene Form des XDP (XDP^-) das Enzym so stark zu beeinflussen, daß auch bei Senkung des pH-Wertes und Zunahme der ungeladenen XDP-Spezies (XDP^o) keine Reduktion beobachtet wird. Wie alle nichtreduzierten Nucleotidanalogen hemmt XDP unabhängig vom pH-Wert die Reduktion von CDP.

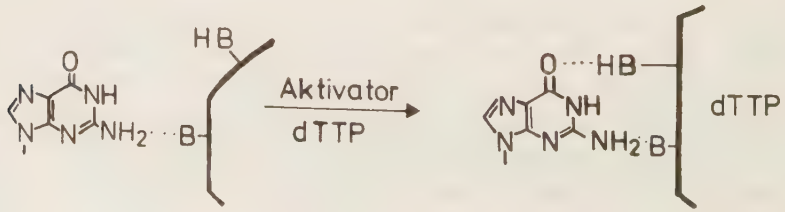
In diese Beobachtungen fügt sich die abnehmende Reduktionsgeschwindigkeit der von Nucleosidantibiotika abgeleiteten Tubercidin- (XII) und Toyocamycindiphosphate (XIII) ein, deren Umsatz sich mit steigendem Raumanspruch des C-7-Substituenten verringert. Das Sangivamycindiphosphat (XIV) mit dem größten Substituenten wird nicht mehr reduziert.

Die optimale Art und Position von exocyclischen Basensubstituenten ist schwieriger zu beurteilen, da man unstimulierten Umsatz von Substrat und aktivierte Reduktion zu einer Beurteilung der Substituentenwirkung trennen muß. Für die Purinnucleotide gibt der Substratumsatz den Anhaltspunkt, daß eine Substitution in der 6-Position durch eine Carbonyl- oder Aminofunktion keinen

Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt, da das unsubstituierte PuDP (XI) ähnlich schnell wie ADP (IV) und IDP (VI) reduziert wird. Führt man dagegen eine Aminofunktion in die 2-Position ein, wie für a^2PuDP (V), erhält man eine Reduktionsgeschwindigkeit, die noch über der von GDP liegt. Der Substituent in der 6-Position verschlechtert eher die Substrateigenschaften wie im Falle des GDP oder des a^2ADP (II).

Betrachtet man dagegen den aktivierten Umsatz, so nimmt die Reduktionsgeschwindigkeit von PuDP über ADP zu IDP erheblich zu, wobei das IDP jetzt noch schneller als das im unstimulierten Substratumsatz besonders aktive a^2PuDP reduziert wird. Aus dieser Reihe ist zu entnehmen, daß das Enzym im aktivierten Zustand sehr wohl einen Substituenten in der 6-Position erkennt und dabei eine Carbonylfunktion bevorzugt. Das beweisen auch das aktiviert am schnellsten umgesetzte GDP und die erheblich langsamere aktivierte Reduktion von a^2ADP.

Eine weitere Aussage läßt sich aus dem Vergleich von a^2ADP,und a^2PuDP und GDP treffen. Obwohl die durch dTTP aktivierte Reaktionsgeschwindigkeit in der obigen Folge steigt, ändert sich der scheinbare K_m-Wert nicht bzw. sehr gering. Ein Aminosubstituent in der 2-Position bestimmt demnach die Affinität ($K_{m(app.)}$) des Nucleotids zum Enzym, während die Struktur der 6-Position V_{max} des aktivierten Umsatzes steuert. Dieses Verhalten legt einen basischen Aminosäureseitenrest zur Fixierung der 2-Position der Purinbase nahe und beim aktivierten Umsatz den zusätzlichen Einfluß eines Wasserstoff-Donors, der in der Nähe der 6-Position mit der Nucleobase wechselwirkt. Das folgende Schema beschreibt diese Vorstellungen.



Eine solche Struktur des aktiven Zentrums stützt weiter die langsame Reduktion des s^6PuDP, da Schwefel bekanntlich ein schlechterer Wasserstoffakzeptor als Sauerstoff ist; aber auch die ausbleibende Reduktion von XDP läßt auf Wechselwirkungen der XTP^--Spezies mit polaren Gruppen im aktiven Zentrum des Enzyms schließen.

Eine weitere Eigenschaft der E. coli-Ribonucleotidreduktase fällt beim Vergleich des Substratverhaltens von PuDP und BzDP (XV) auf. Das völlig unphysiologische BzDP wird fünffach besser als PuDP reduziert und auch durch dTTP höher aktiviert. Das BzDP besitzt sogar bessere Substrateigenschaften als ADP, denn auch der scheinbare K_m-Wert ist noch kleiner als der des dTTP aktivierten ADP-Umsatzes (siehe Tabelle 8). Dieser Befund läßt sich nur erklären, fordert man im aktiven Zentrum der E. coli-Ribonucleotidreduktase starke hydrophobe Anteile bei der Fixierung der Nucleobase. Hydrophobe Bindungsanteile im aktiven Zentrum könnten auch eine Erklärung für die starke Hemmung der GDP- und CDP-Reduktion durch fbzADP (IX) geben, da der Phenylring hydrophobe Wechselwirkungen eingehen kann; allerdings ist eine Trennung vom räumlichen Effekt hier nicht möglich.

3.3.2. Beziehungen zwischen Substrat und Aktivator

Die Versuche mit der E. coli-Ribonucleotidreduktase sollten darüber Aufschluß geben, welche Strukturen eines Aktivatornucleotids mit dem Protein in Wechselwirkung treten und die Spezifität der Stimulation bewirken. Das Enzym wird durch die Aktivatoren dTTP, dCTP und dGTP generell in der Substratreduktion stimuliert, während bei den anderen Desoxyribonucleotiden Beziehungen zu bestimmten Substratmolekülen bevorzugt sind. Andererseits zeigen die starken Konzentrationsunterschiede in der maximalen Stimulation des Substratumsatzes, daß unter physiologischen Bedingungen diese drei allgemeinen Aktivatoren verschiedenartige Einflüsse auf das Enzym ausüben. Die hohe Affinität der high-sites der B_1-

Untereinheit zu dTTP muß hervorgehoben werden. Für die mechanistische Behandlung werden aber nur die Effekte von Desoxyribonucleotiden in sättigender Konzentration verglichen, da nur dann Aussagen unter identischen Bedingungen getroffen werden können. In Tabelle 16 sind die so gewonnenen Substrat-Desoxyribonucleotid-Beziehungen nach der Höhe der Stimulation geordnet, die von 25-facher Aktivierung bis zur Inaktivität des Desoxyribonucleotids reichen.

Tabelle 16
Wirkungen von Desoxyribonucleotiden auf den Substratumsatz

Substrat	Aktivierung >2	≤2	kein Effekt
GDP	dTTP, dCTP, dGTP	br^8dATP	dITP,dATP
ADP	dGTP, dITP, dTTP, dCTP	dATP	br^8dATP
IDP	dTTP, dCTP, dGTP	dATP, br^8dATP, dITP	
CDP	dTTP, br^8dATP, dCTP, dATP	dGTP	dITP
UDP	br^8dATP, dCTP, dTTP, dATP	dGTP	dITP

Aus der Zusammenstellung ist zu entnehmen, daß dTTP durchaus nicht generell der beste Aktivator ist. Es stimuliert zwar die Reduktion von IDP,GDP und CDP optimal, im Falle des ADP und UDP sind aber dGTP bzw. br^8dATP höher wirksam. Auch die ähnlich hohen Effekte anderer Desoxyribonucleotide relativieren eine besondere Funktion des dTTP und zeigen, daß das Protein vielfache Substrat- und Aktivator-Beziehungen vermitteln kann, die bis zu einer Hemmung (a^2PuDP+dITP) reichen. Eine hohe Affinität zu dTTP hindert die B_1-Untereinheit nicht daran, bei der Bindung von ADP eine Strukturänderung einzugehen, die jetzt eine bevorzugte Bindung des dGTP ermöglicht. Dasselbe tritt besonders augenfällig für den unphysiologischen Effektor br^8dATP hervor, der die UDP-Reduktion optimal stimuliert. Durch die Strukturen von Substrat, Protein und Effektor sind die Spezifitäten vorprogrammiert, aber nicht quantitativ endgültig festgelegt; das gilt auch für " unnatürliche " Nucleotide.

Außer durch Desoxyribonucleotide wird die E. coli-Ribonucleotidreduktase auch durch Ribonucleosidtriphosphate aktiviert. Für den physiologisch wichtigen Vertreter ATP haben wir gezeigt, daß eine ATP-artige Aktivierung der CDP- und UDP-Reduktion eine Wasserstoffdonorfunktion in der 6-Position des Purins benötigt. Auch hier stimulieren nicht alle Analogen gleichermaßen gut, sondern in der Reihe ATP > a^2ATP > br^8ATP > fbzATP > s^6PuTP fällt die Aktivierung der Substratreduktion (siehe Tab. 11). Zu unterstreichen ist die Aktivität von br^8ATP; offensichtlich sind die regulatorischen Zentren nicht so streng auf die anti-Konformation der Nucleotide eingestellt wie die Substratbindungsstellen.

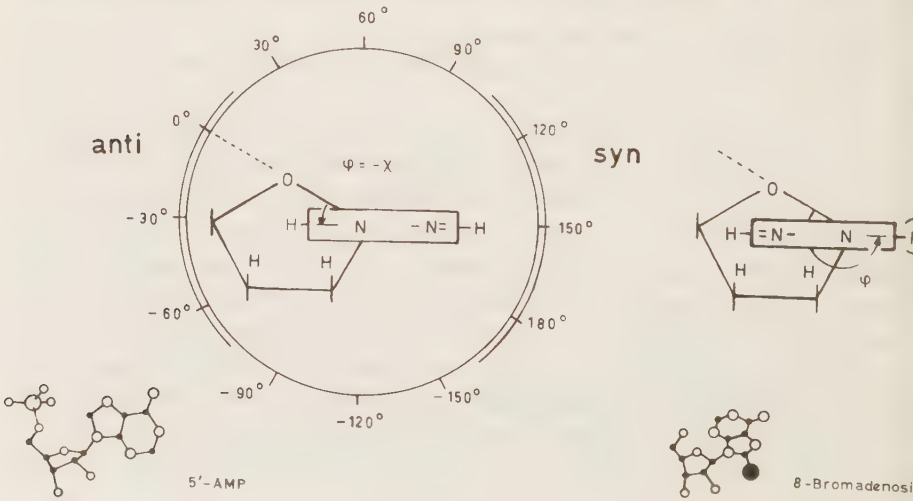
Aktivierende Eigenschaften anderer Ribonucleotide beschreibt die Literatur nur noch für UTP auf den GDP-Umsatz, alle weiteren Ribonucleotide sollen keine stimulierende Wirkung besitzen [40]. Wir haben gezeigt, daß eine merkliche Stimulation durch alle Ribonucleotide bewirkt wird, die in der Größenordnung der Wirkung des dGTP liegt. In der Regel entsprechen die Beziehungen zwischen Substrat und aktivierendem Ribonucleotid der Spezifität des analogen Desoxyribonucleotids, aber es entstehen auch neue Beziehungen wie die Aktivierung des ADP-Umsatzes durch CTP und der UDP-Reduktion durch GTP; letztere ist siebenfach höher als die Wirkung von dGTP (siehe Tab. 10 u. 12).

Für die Wirkung von Cytosinnucleotiden kann man über die Nucleobase hinaus einen spezifitätssteuernden Einfluß der Zuckerstruktur erkennen: CTP aktiviert die ADP-Reduktion so hoch wie dGTP, dCTP bewirkt nur eine geringe Stimulation während araCTP keinen Effekt mehr ausübt. Im Gegensatz zur Substratbindungsstelle, bei der eine Veränderung der Ribosestruktur eine Reduktion völlig verhindert, tolerieren die high-sites der B_1-Untereinheit nicht nur die unterschiedlichen Zuckerstrukturen (Desoxyribose, Ribose, Arabinose), sondern sie bestimmen zusammen mit der Nucleobase die Art der Wechselwirkung mit dem Substrat.

3.4. Bedeutung der Molekülkonformation

Die enzymatische Inaktivität von 8-Bromadenosin- und Formycinnucleotiden ist bisher mit einer besonderen Molekülkonformation begründet worden, doch bedarf dies einer genaueren Betrachtung. Tatsächlich ist ein wichtiges Strukturmerkmal von Nucleotiden die Konformation ihrer Base und der Phosphatreste relativ zum zentralen Ribose- oder Desoxyribosering des Moleküls. In den natürlichen Purin- und Pyrimidinnucleotiden dominieren die sogenannte anti-Position des Aglycons und die gauche, gauche-Position an C-5'wegen dann möglicher intramolekularer Wechselwirkungen (Abbildung 21). Dies ist durch Kristallstrukturanalysen unter anderem für die Ribonucleotidreduktase-Substrate ADP und CDP belegt [70,71], und für Lösungen durch zahlreiche Protonenresonanzspektroskopie- (PMR-) Untersuchungen [72,73]. Allerdings lassen die PMR-Spektren erkennen, daß auch oft nennenswerte Konzentrationen der syn-Konformation im Gleichgewicht vorliegen.

Abbildung 21
Molekülkonformationen von Nucleotiden



Im Schema steht die N9 - C1'-Glycosidbindung des Nucleotids senkrecht zur Papierebene in Blickrichtung des Betrachters.

Über die Aktivierungsenergien für die Rotation der Molekülteile ist nicht viel bekannt, sie scheinen um 3 bis 6 kcal/Mol zu liegen [74]. Für die 5'-Monophosphate (und erst recht die Di- und Triphosphate) aller acht häufigen Ribo- und Desoxyribonucleoside darf man bei Normaltemperatur die anti-Konformation als Grundlage ihrer Beziehungen zu Enzymproteinen annehmen. Das ist für dATP und dTTP bei Bindung an DNA-Polymerase I bewiesen[75]. Die Konformation in Lösung von Xanthosin, Inosin, Nebularin (Purinribosid), 2-Aminopurinribosid und N^6-Isopentenyladenosin gleichen weitgehend denen von Adenosin oder Guanosin [76,77]. Völlig abweichend verhält sich jedoch 8-Bromadenosin und sein 5'-Phosphat, für das durch Kristallstrukturanalyse sowie PMR-Untersuchungen eine syn- oder intermediäre Konformation (Querstellung der Base) gefunden wurde [78]. Für diese Drehung wird der raumerfüllende 8-Substituent verantwortlich gemacht. Ebenso stark weicht die syn-Konformation des (von uns nicht untersuchten) Nucleosidantibiotikums Formycin vom isomeren Adenosin ab, da ihm vermutlich eine intramolekulare Dipolstabilisierung fehlt [72].

Es kann somit kein Zufall sein, daß die 8-Bromadenosin- und Formycinnucleotide [31] keine Substrate der beiden bakteriellen Ribonucleotidreduktasen sind. Während die Enzyme, wenn auch i.a. mit geringerer Affinität, substituierte oder unsubstituierte Purinbasen im katalytischen Zentrum akzeptieren, verhindert eine syn- oder Querstellung vollkommen die Reduktion eines solchen Nucleotids. Die Inaktivität der 8-Bromadenosinnucleotide als Substrate der Ribonucleotidreduktasen ist ein neues Beispiel für die wahrscheinlich allgemeingültige Alles- oder Nichts-Spezifität nucleotidumsetzender, kataboler und anaboler Enzyme für die anti-Konformation, denn auch Ribonucleasen, Phosphodiesterasen, DNA- und RNA-Polymerasen sowie Polynucleotidphosphorylase setzen syn-Nucleotide als Substrate nicht um. Ursachen und biochemische Bedeutung dieser Struktur- Funktionszusammenhänge werden von Follmann an anderer Stelle ausführlich dargestellt [73,79]. Umgekehrt kann man auch die wichtige Aussage machen, daß die für alle anderen modifizierten Ribonucleotide

beobachteten Aktivitätsunterschiede allein auf deren Substitutionsmustern beruhen müssen.

Schwieriger ist die Aktivität des br^{8}dATP als Effektor der L. leichmannii- und der E. coli-Ribonucleotidreduktase zu interpretieren. Bei dem L. leichmannii-Enzym zeigt das entsprechende Ribonucleotid br^{8}ATP keine Wirkung, während bei der E. coli-Ribonucleotidreduktase br^{8}ATP wie ATP, wenn auch schwächer, stimuliert. Das kann auf unterschiedlichen Konformationsspezifitäten der Enzyme beruhen, oder aber nur E. coli-Ribonucleotidreduktase, die relativ stark durch Ribonucleotide aktiviert wird, läßt eine leichte Stimulation durch br^{8}ATP noch erkennen, während die generell geringen Effekte von Ribonucleotiden bei dem L. leichmannii-Enzym eine Aktivierung durch br^{8}ATP nicht mehr ermöglichen. Andererseits muß br^{8}dATP nicht unbedingt eine mit br^{8}ATP identische Konformation besitzen, da Desoxyribonucleotide eine etwas höhere Flexibilität ihrer Zuckerkonformation (und damit gekoppelt der Basenkonformation) als die entsprechenden Ribonucleotide besitzen können [80]. Die Literatur gibt keinerlei Information über syn-Konformationen bei Desoxyribonucleotiden der Purinreihe. Eine PMR-Untersuchung des br^{8}dAMP läßt mangels weiterer Modellverbindungen ebenfalls noch keine eindeutige Konformationsbeschreibung zu, es zeigt sich jedoch, daß die Veränderung der chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten für H-2 des Purins und H-2' des Zuckers (das sind die durch Konformationsänderungen am stärksten betroffenen Protonen) beim Übergang von AMP zu br^{8}AMP und von dAMP zu br^{8}dAMP n i c h t gleichgerichtet sind [79]. Wir vermuten daher, daß die Aktivierungsbarriere für eine Drehung um die Glycosidbindung im br^{8}dATP gering ist und das Molekül in einer noch nicht genau bekannten, aber von dATP verschiedenen Konformation gebunden wird. Die Frage nach einer Konformationsspezifität beider bakterieller Ribonucleotidreduktasen an den regulatorischen Bindungsstellen kann man vielleicht so beantworten, daß sie in der Lage sind, konformationsflexible Nucleotide auszurichten und selbst zur Orientierung des Nucleotids beitragen; eine derartige geringe Hilfeleistung zur Konformationsanpassung von dTTP an DNA-Polymerase

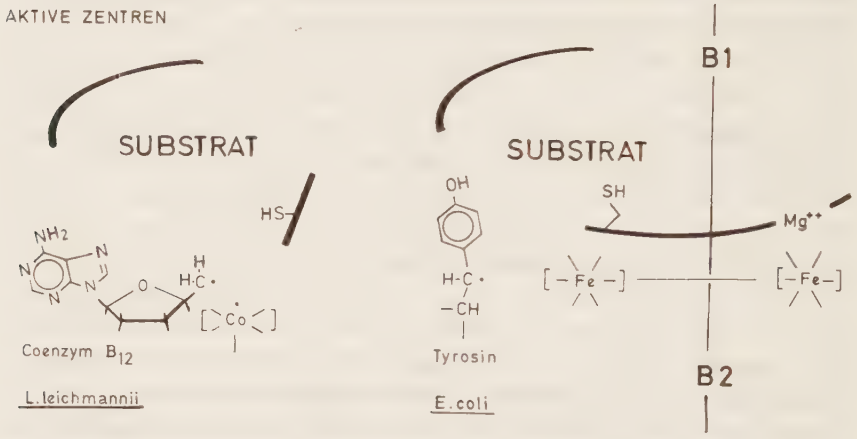
wurde gefunden [75]. Das würde die mehrdeutige Aktivität bei der Stimulierung der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase (siehe Tab. 4) und das von dATP verschiedene Verhalten (in der verwendeten Konzentration kein Inhibitor) bei dem E. coli-Enzym zwanglos erklären. Die Konformation dieser Verbindung bedarf jedoch einer endgültigen Aufklärung.

3.5. Vergleich der Eigenschaften der bakteriellen Ribonucleotidreduktasen

3.5.1. Gemeinsamkeiten beider Enzyme

Auf dem ersten Blick scheinen keine Gemeinsamkeiten zwischen Ribonucleosidtri- und Diphosphatreduktase vorhanden zu sein, da ihr Proteinaufbau und die Regulation durch Nucleotide verschieden sind. Die in jüngster Zeit in beiden Fällen nachgewiesenen Radikalzwischenstufen weisen jedoch auf Gemeinsamkeiten, die bei näherer Betrachtung immer zwingender werden. Bei dem E. coli-Enzym binden sämtliche Nucleotide an nur eine Untereinheit. Trennt man die beiden Polypeptidketten der B_1-Untereinheit, erhalt man zwei Proteine vom Molekulargewicht 80 000 mit Bindungsstellen für ein Substrat- und zwei Regulatornucleotide. Die Ribonucleotidreduktase aus L. leichmannii besitzt eine Substratbindungsstelle und zwei regulatorische Zentren bei einem Molekulargewicht von 76 000; für die Ribonucleotidreduktase aus der Grünalge Scenedesmus obliquus ist ein Molekulargewicht von etwa 85 000 bestimmt worden [5]. Diese nucleotidbindende Grundeinheit benötigt als Teil des aktiven Zentrums eine radikalbildende Komponente, die das Coenzym B_{12} bzw. die Untereinheit B_2 darstellen. Abbildung 22 beschreibt die bisher bekannten zur Enzymaktivität benötigten Strukturen beider Enzyme.

Abbildung 22
Mindeststrukturen der aktiven Zentren von E. coli und L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase



In beiden Fällen existiert das Radikal an einer Methylengruppe, das durch komplex gebundenes Kobalt oder Eisen in der high-spin Form stabilisiert wird. In dem E. coli-Enzym liegt das Radikal in der benzylständigen Methylengruppe eines Tyrosin-Seitenrestes, bei der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase ist es am 5'-Desoxyadenosylrest von Coenzym B_{12} lokalisiert. Am Verlauf der Reaktion sind Thiolgruppen der Enzyme beteiligt, deren genaue Lage und Funktion noch nicht ausreichend geklärt sind.

Einen direkten Vergleich der B_2-Untereinheit mit dem Coenzym B_{12} stützen auch kinetische Daten. Für beide Enzyme sind die Abhängigkeiten der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Coenzym B_{12} bzw. der Untereinheit B_2 bestimmt worden. Die Anwesenheit eines Aktivators verringert den K_m-Wert für das Coenzym der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase, und die unter diesen Bedingungen lineare Kinetik in der Lineweaver-Burk-Auftragungsweise zeigt eine Sättigung des Enzyms mit Coenzym an. Auch für

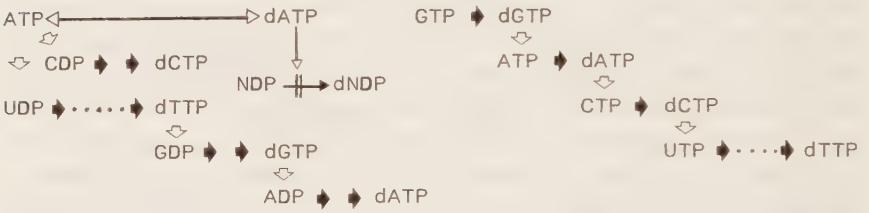
die E. coli-Ribonucleotidreduktase haben wir in Anwesenheit eines Aktivators ein Sattigungsverhalten gegenüber der Untereinheit B_2 nachgewiesen. Im Gegensatz dazu werden bei der nichtaktivierten Substratreduktion durch das L. leichmannii-Enzym über zehnfach höhere Konzentrationen an Coenzym B_{12} zur Sättigung benötigt. Eine solche Verhaltensweise trifft auch für die Ribonucleotidreduktase aus E. coli zu, da in dem untersuchten Konzentrationsbereich der nichtaktivierten Substratreduktion die Umsatzgeschwindigkeit mit der B_2-Konzentration linear ansteigt (siehe Abb. 13). Unter diesen Bedingungen liegt beim aktivierten Umsatz bereits eine Sättigung mit B_2 vor. Betrachtet man die Untereinheit B_2 des E. coli-Enzyms analog zu der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase als " Coenzym ", so fällt es leichter, ihre Funktion und das Fehlen von Nucleotidbindungsstellen zu verstehen.

3.5.2. Nucleotidspezifitäten der Ribonucleotidreduktasen

3.5.2.1. Physiologische Bedeutung

Die bisher charakterisierten Ribonucleotidreduktasen reduzieren alle vier Ribonucleotide und zeichnen sich durch eine komplexe Regulation über (Ribo-) Desoxyribonucleotide aus. Neuere Ergebnisse mit teilweise gereinigten Ribonucleotidreduktasen aus Säugetierzellen legen zwar verschiedene Enzyme für die Purin- und Pyrimidinreduktion nahe [81,82]; eine endgültige Klärung dieser Beobachtungen können aber erst hochgereinigte Enzympräparationen geben, da kompliziert aufgebaute Enzyme mit mehreren regulatorischen oder katalytischen Untereinheiten solche Effekte vorzutäuschen vermögen. Bevor solche noch komplizierteren Systeme analysiert werden können, ist es nötig, die Regulationsmechanismen bei den einfacher gebauten bakteriellen Ribonucleotidreduktasen zu verstehen. Prinzipiell besteht eine Schwierig-

keit darin, daß vier verschiedene Substrate in annähernd gleichem Maße umgesetzt werden müssen, die vier Basenstrukturen sich aber ganz erheblich voneinander unterscheiden. Bei den bakteriellen Ribonucleotidreduktasen sind die folgenden Zusammenhänge aufgestellt worden, die dieses Ziel gewährleisten sollen [18,40]:



E. coli L. leichmannii

Symbole: ➧ Umsatz zu .. ; ⇩ aktiviert die Reduktion von ...;
⟶▷ hemmt die Reduktion von ... ; ⟶‖ kein Umsatz zu...
◁⟷▷ Gleichgewicht zwischen den Nucleotiden bedingt ....

Im Falle der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase scheint durch die " kaskadenartige " Folge der Aktivierung des jeweiligen Substratumsatzes eine ausgewogene Bereitstellung von Desoxyribonucleotiden gewährleistet. Kompliziertere Zusammenhänge bietet schon die E. coli-Ribonucleotidreduktase, wo neben einer Steuerung der Grundaktivität durch ATP und dATP keine so spezifischen Substrat-Aktivator-Beziehungen wie bei dem L. leichmannii-Enzym zu finden sind. Das drückt sich in vitro in den stark unterschiedlichen Affinitäten der E. coli-Ribonucleotidreduktase zu den Aktivatoren aus, zum anderen werden UDP und ADP auch bei Anwesenheit des besten Aktivators nur halb so schnell wie die beiden anderen Substrate CDP und GDP reduziert. Auch bei der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase wird UTP nur mit einem Drittel der Reaktionsgeschwindigkeit der anderen Substrate bei Anwesenheit des Aktivators reduziert. Versucht man von dem in vitro

Verhalten auf in vivo-Verhältnisse zu extrapolieren so ist intrazellulär die Anwesenheit aller Desoxy- und Ribonucleotide vorauszusetzen. Starke Konkurrenz der Aktivatoren um die regulatorischen Bindungsstellen und komplexe Wechselwirkungen wie Hemmung durch dTTP-ATP-Kombinationen bei dem E. coli-Enzym sind jedoch bekannt und müßten für die physiologische Situation mitberücksichtigt werden. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit, die eine Wirkung aller Nucleosidtriphosphate auf die Ribonucleotidreduktasen belegen, scheinen uns starke Zweifel an der Gültigkeit der oben aufgeführten Aktivierungsmuster angebracht, da sie unter physiologischen Bedingungen kaum funktionieren können.

Die Reduktion unnatürlicher Nucleotide wie Benzimidazolribosid oder der Nucleosidantibiotika Nebularin (Purinribosid), Tubercidin und Toyocamycin wirft die Frage auf, inwieweit eine dann mögliche Inkorporation solcher Nucleotide in die DNA ihre Replikation behindert. Wir haben an anderer Stelle solche möglichen Wirkungsweisen ausführlich diskutiert [69]. Die in der Regel geringen Substrateigenschaften dieser Nucleotide lassen uns annehmen, daß die DNA-Replikation nicht beeinträchtigt wird, da die entsprechenden Desoxyribonucleotide sich kaum in wirksamen Konzentrationen anhäufen können. Als wichtig für andere Angriffspunkte im Organismus ist jedoch festzuhalten, daß die Existenzfähigkeit solcher modifizierter Desoxyribonucleotide durchaus wahrscheinlich ist.

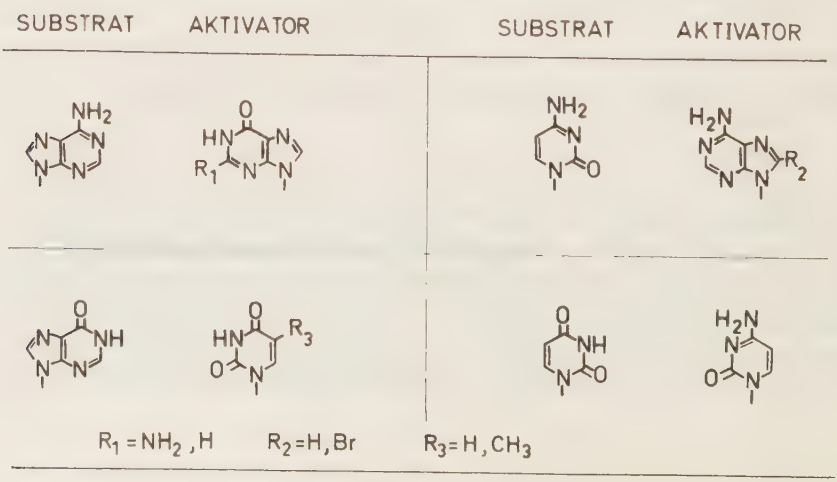
3.5.2.2. Mechanismus der Substrat-Aktivator-Erkennung

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, Anhaltspunkte für die Strukturen zu finden, die Substrat / Enzym / Aktivator funktionell miteinander verbinden und die wir in dem Aufbau der Nucleobase vermuteten. An der Substratbindungsstelle bestimmen Phosphatrest und Zuckerstruktur, ob ein Nucleotid reduziert wird oder nicht; die individuellen Reaktionsgeschwindigkeiten regelt

die Nucleobase. Beim Vergleich der besten Substrate fällt auf, daß beide Enzyme Guanosinnucleotide und Cytidinnucleotide bevorzugt umsetzen. Die geringste Affinität auch bei Anwesenheit eines Aktivators besteht für die Uridinnucleotide. Wie zuvor schon ausführlich beschrieben, besitzen Nucleotide mit Amino- und Carbonylfunktionen die besten Substrateigenschaften.

Die regulatorischen Zentren zeigen eine nicht so strenge Spezifität für die Nucleotidkomponenten, lediglich der Triphosphatrest ist stets erforderlich. Die Zuckerstruktur regelt mehr die Höhe der Wechselwirkung mit dem Substrat, obwohl in einigen Fällen durch sie auch Spezifitäten geprägt werden. Die eigentlich spezifische Wechselwirkung mit einem bestimmten Substrat liegt aber auch hier in der Basenstruktur begründet, sodaß aus den Nucleobasen der " sich entsprechenden " Substrat- und Aktivatornucleotide Strukturelemente für die Spezifität der Wechselwirkung zu erkennen sein müssten. Obwohl beide Enzyme verschiedenen Aktivierungsmustern gehorchen, sind überraschend viele ähnliche Substrat- und Aktivatorbeziehungen vorhanden. In Abbildung 23 sind die Basenstrukturen von Aktivator und Substrat gegenübergestellt, die bei beiden Enzymen eine hohe Stimulation bewirken.

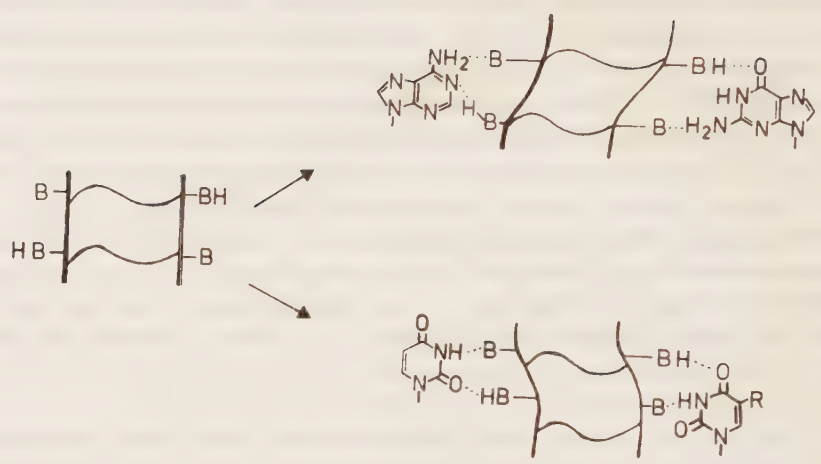
Abbildung 23
Basenstrukturen der optimalen Substrat- und Aktivatorkombinationen bei den bakteriellen Ribonucleotidreduktasen



Besonders große Übereinstimmung ergibt sich bei den Purinnucleotiden, da die potentesten Aktivatornucleotide für beide Enzyme gemeinsam sind. Differenziertere Effekte liegen für die Pyrimidinnucleotide vor, da dTTP bei E. coli die CDP-Reduktion am effektivsten stimuliert; die Doppelfunktion des dATP als Aktivator und Inhibitor verdeckt hier offenbar die Parallelen, da dATP in sättigenden Konzentrationen als Inhibitor wirkt. Deutlicher ist die Übereinstimmung bei der Stimulation der Uridinphosphat-Reduktion, denn eine Wirkung des bei E. coli ebenfalls guten Aktivators ist bei dem L. leichmannii-Enzym immerhin angedeutet: dTTP und dUTP sind in der Lage, eine leichte Aktivierung der UTP-Reduktion durchzuführen.

Versucht man gemeinsame Strukturelemente bei den Basen von Substrat und Aktivator zu finden, stößt man auf zwei Gruppen von Beziehungen, die auch für weitere Substrat-Aktivator-Paare gültig sind: Einmal erganzen sich Wasserstoffdonor- und Akzeptorfunktionen bei den sich entsprechenden Nucleotiden wie im Falle der Adenosinphosphate (dGTP, dITP) und Uridinphosphate (dCTP), zum anderen können bei beiden Nucleotiden Akzeptorfunktionen (Carbonylgruppen) oder Donorfunktionen (Aminogruppen) sich entsprechen.

Wir haben für die aktiven Zentren der beiden Ribonucleotidreduktasen zwei basenfixierende Aminosäureseitenreste mit basischem und sauren Charakter gefordert. Im Falle der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase liegt wahrscheinlich das Anion einer Asparagin- oder Glutaminsäure als basischer Rest vor. Wir fordern für die regulatorischen Zentren beider Enzyme ebenfalls die Anwesenheit eines Wasserstoffbrückendonators und-Akzeptors, wodurch eine Erkennung von Art, Zahl und Position der Basensubstituenten gewährleistet ist.



In dem Schema sind zwei mögliche Wechselwirkungen der beiden sich entsprechenden Substituentengruppen der Nucleobasen von Aktivator und Substrat dargestellt. Diese Formen der Wechselwirkungen lassen sich verallgemeinern und sind offenbar für alle hier untersuchten Nucleotide gültig. Die Effiziens der jeweiligen Beziehungen hängt dann nur noch von der dazwischenliegenden Proteinstruktur ab. Da wir bei beiden Enzymen eine Reihe von Substraten und Aktivatoren gefunden haben, die in allen Abstufungen von höchster Aktivierung bis Hemmung wirksam sind, scheidet eine lediglich den Katalyseprozeß begünstigende Umformung des aktiven Zentrums durch den Aktivator aus, da in diesem Falle keine spezifischen Substrat- und Aktivatorpaarungen zu bemerken wären. Vielmehr müssen Substrat und Aktivator bei der Wechselwirkung mit dem Enzym einen Abdruck ihrer Struktur dem Protein vermitteln, und nur diejenigen Paarungen von Aktivator- und Substratnucleotiden führen zu einer Stimulation, die durch entsprechende Strukturen die notwendigen Konformationsänderungen des Proteins energetisch begünstigen oder stabilisieren können. Wir nennen diesen Vorgang einen " two-sided induced fit " als Bezeichnung für ein sehr flexibles Enzymverhalten, das durch zwei sich strukturell entsprechende Liganden ausgelöst wird [69].

Der hier vorgeschlagene Mechanismus des " two-sided induced fit " hat auch Konsequenzen für die eingangs vorgestellten mechanistischen Modelle. Man muß nicht nur für jeden Effektor eine eigene Enzymspezies formulieren, sondern erhält bei gleichem Effektor je nach Substrat eine weitere jeweils unterschiedliche Enzymspezies. Die Auswirkungen der einzelnen Molekülarten auf die Bindung des Coenzyms bzw. der B_2-Untereinheit sind noch nicht untersucht worden, es ist lediglich eine stärkere Bindung der Cofaktoren an das Enzym bei Anwesenheit eines Aktivators bekannt. Ein kinetisches Modell der Ribonucleotidreduktasen muß sicherlich eine unterschiedliche Bindung der Cofaktoren an die einzelnen Enzymspezies berücksichtigen.

3.5.2.3. Artspezifische Unterschiede der Enzyme

Bei der hier diskutierten Übereinstimmung beider bakterieller Ribonucleotidreduktasen darf man aber nicht über wichtige Unterschiede im Feinaufbau hinwegsehen. So sind bei der E. coli-Ribonucleotidreduktase alle nucleotidbindenden Zentren in der isolierten B_1-Untereinheit für eine Gleichgewichtsdialyse zugänglich [42], die L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase läßt unter diesen Bedingungen die Bindung nur eines Aktivatornucleotids zu. Eine Substratbindung oder eine weitere Regulatorbindungsstelle kann unter Gleichgewichtsbedingungen nicht festgestellt werden [20]. Die Struktur der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase scheint demnach stärker dem Einfluß ihrer Liganden zu unterliegen, sodaß man einen " multi-site induced fit " annehmen muß, der auch die geordnete Bindungsfolge der Reaktionspartner erklären kann.

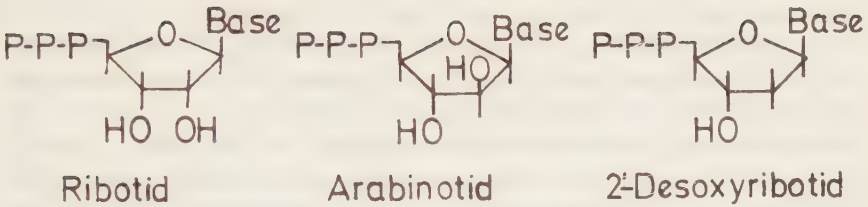
Einige modifizierte Nucleotide, die von dem L. leichmannii-Enzym als Substrate akzeptiert werden, setzt die E. coli-Ribonucleotidreduktase nicht um. So werden N^6-Dimethyladenosintriphosphat und Sangivamycintriphosphat noch reduziert, während

das E. coli-Enzym die entsprechenden Diphosphate nicht mehr umsetzt. Auch Xanthosindiphosphat wird nicht von E. coli-Ribonucleotidreduktase reduziert, obwohl das Nucleotid keine anspruchsvollen Substituenten oder außergewöhnliche Konformation besitzt.Hier ist die negativ in der Base geladene XDP^--Spezies wie auch bei L. leichmannii als Substrat inaktiv; andererseits beobachtet man auch bei niedrigerem pH-Wert (20% XDP^0) keine Reduktion. Wir deuten diesen Befund so, daß die E. coli-Ribonucleotidreduktase wie das Enzym aus L. leichmannii das anionische Substrat XDP^- auf Grund elektrostatischer Abstoßung durch basische Aminosäurereste im aktiven Zentrum nicht reduziert, die XDP^--Form aber dennoch das E. coli-Enzym stark hemmen kann.

Ein unterschiedlicher Aufbau der aktiven Zentren beider Enzyme, polar für L. leichmannii-, weniger polar für die E. coli-Ribonucleotidreduktase, ist besonders gut an dem Verhalten beider Enzyme gegenüber Purinnucleosid- und Benzimidazolnucleosidphosphat zu erkennen. Bei der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase wird PuTP wesentlich besser als BzTP reduziert, während sich für das E. coli-Enzym die Situation entgegengesetzt darstellt, mehr noch, BzDP ist ein noch besseres Substrat als ADP. Trotz dieser verschiedenen Umgebung des HB-/B-Systems, die bei dem E. coli-Enzym durch eventuell nur einen aromatischen Aminosäureseitenrest im aktiven Zentrum verursacht werden kann, werden die Reduktionsgeschwindigkeiten von Nucleotiden mit exocyclischen Basensubstituenten von deren Art, Zahl und Position für beide Enzyme in gleicher Art und Weise bestimmt.

3.6. Einfluß von Arabinonucleotiden auf die bakteriellen Ribonucleotidreduktasen

Arabinonucleotide gehören zu der Gruppe von zuckermodifizierten Nucleotiden und ähneln in ihrer Struktur sowohl den Desoxy- als auch den Ribonucleotiden. Wir haben die Arabinonucleotide



in unsere Untersuchungen miteinbezogen, da sie eine starke cytostatische und antivirale Wirkung besitzen, deren Angriffspunkte auf molekularer Ebene noch nicht umfassend geklärt sind. Es war außerdem bekannt, daß sie als einzige Nucleotide den Umsatz der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase stark hemmen, sodaß auch aus mechanistischen Gründen eine nähere Untersuchung angebracht war.

Bei der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase wirken beide getesteten Arabinonucleotide (araCTP und araATP) als Inhibitoren, jedoch in unterschiedlicher Stärke und nach verschiedenem Mechanismus. Das araATP hemmt die Ribonucleotidreduktion am effektivsten und zeigt die gleiche Wirkung (50% Inhibierung des Umsatzes, Tab. 5 u. 6) bei allen getesteten Nucleotiden auch dann, wenn der spezifische Aktivator vorhanden ist. Die Hemmung scheint deshalb unabhängig von kompetitiven Mechanismen zu sein, da nicht alle Aktivatoren gleiche Affinitäten zum Enzym besitzen, andererseits die araATP-Hemmung unabhängig vom Effektor wirkt. Eine kompetitive Hemmung des Substratumsatzes durch araATP schließt der gefundene nicht-kompetitive Hemmtyp der ATP+araATP-Reduktion tatsächlich aus (Abb. 9). Andererseits läßt sich aus Gleichgewichtsdialysen bestimmten Effektorbindungskonstanten keinerlei bevorzugte Bindung von araATP erkennen [20], sodaß aus diesen Daten nicht auf einen Mechanismus der araATP-Hemmung geschlossen werden kann. Am wahrscheinlichsten wäre ein Einfluß auf die Bindung des Coenzym B_{12} über die regulatorischen Zentren, der hier nicht weiter untersucht worden ist.

Einfacher ist eine Aussage über die Wirkung des araCTP möglich, da es im gleichen Konzentrationsbereich wie araATP die ATP-Reduktion kompetitiv hemmt (Abb. 10). Auch die Effekte auf verschiedene Substrate und Substrat-Aktivator-Paare (Tab. 5 u. 6) zeigen an, daß araCTP bei seiner Hemmung um eine Bindung konkurrieren muß, da mit effektiverer Bindung von Substrat und höherer Reduktionsgeschwindigkeit mehr araCTP zur gleichen Hemmwirkung benötigt wird. Die unter diesen Bedingungen aufgenommenen Daten stehen in keinem Fall einem im Bezug auf Substrat kompetitiven Wirkungsmechanismus des araCTP entgegen.

Bei der E. coli-Ribonucleotidreduktase gibt es für Arabinonucleotide zwei Möglichkeiten, auf das Enzym einzuwirken: Einmal als Substratanaloge auf der Diphosphatstufe, zum anderen als Triphosphate auf die regulatorischen Zentren; beide Möglichkeiten haben wir untersucht. Die dem Substrat analogen Diphosphate des Arabinocytidins und Arabinoadenosins werden nicht reduziert, sondern wirken als Inhibitoren der Substratreduktion. Wie bei dem L. leichmannii-Enzym ist araCDP ein erheblich schlechterer Inhibitor als araADP. Letzteres wirkt auf die aktivierte GDP- und CDP-Reduktion als kompetitiver Inhibitor ($K_{i(app.)} = 1 \times 10^{-5}$ M bzw. 3.4×10^{-5} M, Abb. 19 u. 18) und entspricht in dem Hemmtyp den basenmodifizierten Nucleotiden m_2^6ADP und br^8ADP, die beide keine Substrate sondern kompetitive Inhibitoren der E. coli-Ribonucleotidreduktase sind (Abb. 17).

An den regulatorischen Zentren der E. coli-Ribonucleotidreduktase wirken dagegen araCTP und araATP völlig verschieden. Das araCTP wirkt als allosterer Aktivator und folgt in seiner Spezifität und Effiziens dem CTP (Ausnahme: auf ADP, siehe Tab. 12), während araATP die Reduktion von CDP und GDP auch in Anwesenheit von dTTP bzw. ATP hemmt (Abb. 20). Wie araATP die Hemmung ausübt, über die high-sites oder low-sites der B_1-Untereinheit, läßt sich nicht entscheiden, da araATP sowohl wie ATP als auch wie dATP erkannt werden könnte.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Spezifitäten der bakteriellen Ribonucleotidreduktasen für den Zucker und besonders den Basenteil eines Nucleotids sind auch für die Arabinonucleotide gültig. Die Arabinose der beiden Nucleotide bestimmt nicht allein die Hemmwirkung, vielmehr bestimmt die Nucleobase das Ausmaß der Hemmung oder Aktivierung. Den Einfluß der Base kann man durch einen Vergleich mit den Desoxyribonucleotiden abschätzen. Bei dem Lactobacillus leichmannii-Enzym durchgeführte Gleichgewichtsdialysen haben eine fünffach schwächere Bindung des dCTP als die des dATP festgestellt [20]; bei der E. coli-Ribonucleotidreduktase benötigt man eine fünffach höhere Konzentration an dCTP als bei anderen Desoxyribonucleotiden, um eine maximale Aktivierung zu erhalten. Die Werte zeigen an, daß Cytosin in einem Desoxyribonucleotid für eine schwächere Bindung an die bakteriellen Ribonucleotidreduktasen verantwortlich ist. Überträgt man diese Befunde auf die Arabinonucleotide, was wohl wegen der ähnlichen Strukturen statthaft ist, kann man die generell geringere Hemmwirkung von Arabinocytidinphosphaten gegenüber Arabinoadenosinphosphaten zwanglos erklären. Als Konsequenz daraus beobachtet man bei der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase für araCTP ein normal kompetitives Hemmverhalten; aber auch an den regulatorischen Zentren wird es von Substratmolekülen und vor allem Aktivatoren kompetitiv verdrängt. Die mögliche Hemmwirkung des araATP über eine stärkere Bindung an die regulatorischen Zentren mag wohl für die nicht-kompetitive Inhibierung der ATP-Reduktion gelten, erklärt aber nicht, daß in Kinetiken keine erkennbare Konkurrenz von araATP und Desoxyribonucleotiden um die regulatorischen Zentren stattfindet.

Für das Enzym aus E. coli gilt ebenfalls, daß die schwächere araCDP-Hemmung durch die Nucleobase bestimmt ist. Die Effekte beider Arabinonucleotide entsprechen in ihrem Mechanismus dem der nichtumgesetzten basenmodifizierten Ribonucleotide, nur ist hier die konzentrationsabhängige Hemmwirkung gleich und von der Basenstruktur unabhängig (m_2^6ADP, br^8ADP). Modifiziert man also andere Teile eines Nucleotids als die Base, bleibt ein wirkungssteuernder Effekt der Nucleobase erhalten, den man bei Interpre-

tationen berücksichtigen muß. Als extremes Beispiel eines solchen von der Nucleobase bestimmten Effektes dient das gegensätzliche Verhalten von araCTP und araATP: Das araCTP wirkt als Aktivator (sein unterschiedliches Verhalten zu CTP und dCTP ist schon diskutiert worden, S. 68), dagegen wirkt araATP als Inhibitor der Ribonucleotidreduktion. Der Einfluß des araATP läßt sich mit dem des dATP für das E. coli-Enzym vergleichen, obwohl eine höhere Konzentration des araATP zur totalen Inhibierung benötigt wird. Es fällt schwer, die im Vergleich zu araCTP jeweils stärkere und verschiedene Hemmwirkung des araATP lediglich mit einer höheren Affinität der bakteriellen Ribonucleotidreduktasen zu dem Adenin-Teil des Arabinonucleotids zu begründen. Leider ist über die Konformation von Arabinonucleotiden nicht genug bekannt, um diese besonderen Effekte des araATP auf eine ungewöhnliche Konformation zurückführen zu können. PMR-Studien zeigen keine dramatischen Unterschiede zu Ribonucleotiden; so gilt für AMP und araAMP gleichermaßen die anti, gauche-gauche-Molekülform [83]. Einen entscheidenden Beitrag für die Erklärung der unterschiedlichen Aktivatoreigenschaften: Desoxyribo-> Ribo-> Arabino- ≫ Xylonucleotid sehen wir in der Ausrichtung der 3'-Hydroxylgruppe relativ zum Protein. Deren Konformation ist allerdings nach PMR-Daten von sovielen anderen Strukturparametern des Moleküls abhängig, daß es im Augenblick unmöglich scheint, eine Korrelation mit dem Enzymverhalten aufzuzeigen. Auf jeden Fall muß man konstatieren, daß beide Ribonucleotidreduktasen äußerst empfindlich auf sehr geringe Struktur- und Konformationsänderungen reagieren, was an der völligen Inaktivität der Xylonucleotide zu erkennen ist [19].

Die hier präsentierten Ergebnisse lassen eine starke physiologische Hemmung der bakteriellen Ribonucleotidreduktasen durch Arabinocytidinnucleotide unwahrscheinlich erscheinen. Andererseits muß für Arabinoadenosinnucleotide zur Klärung physiologischer Vorgänge eine Hemmung der Ribonucleotidreduktasen durchaus in Betracht gezogen werden. Unsere Untersuchungen zeigen weiterhin die Schwierigkeiten, die bei der Erarbeitung eines allgemeinen Konzepts für die cytostatische Wirkung der Arabino-

nucleotide auftreten. Nicht nur sind die beobachteten Effekte der Arabinonucleotide von Organismus zu Organismus verschieden, auch die Substanzen selbst greifen in unterschiedlicher Weise in dieselben Stoffwechselwege ein. Eine Verallgemeinerung von Befunden wird nur für verwandte Organismen möglich sein.

4. Experimenteller Teil

4.1. Enzymreinigungen

4.1.1. Reinigung der Ribonucleotidreduktase aus E. coli

Zucht von E. coli B3 (ATCC 23 851)
Von einem Schrägagar wurden die Bakterienzellen in eine 2 l Schüttelkultur überführt, die als Inoculum eines 200 l -Fermenters diente. Das Kulturmedium bestand aus (ergänztes Davis-Minimalmedium) :

K_2HPO_4	7.0 g	EDTA x 2 H_2O	18.61 mg
KH_2PO_4	3.0 g	$CaCl_2$ x 2 H_2O	0.74 mg
Na_3citrat x 3 H_2O	0.5 g	$FeCl_3$ x 6 H_2O	16.22 mg
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0.1 g	$ZnSO_4$ x 7 H_2O	0.17 mg
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g	$CuSO_4$	95.8 µg
Glucose	2.0 g	$MnSO_4$ x H_2O	0.1 mg
Thymin	2 mg	$CoCl_2$ x 6 H_2O	0.18 mg

Die Angaben beziehen sich auf 1 l Medium.

Die 200 l -Fermenterkultur wurde als Inoculum eines 3000 L -Fermenters eingesetzt, nur daß im Kulturmedium 0.12 mg Thymin / l vorhanden waren. Nach 7 Stunden Wachstumsdauer bei 37 °C war eine Zelldichte von 2.3 $OD_{578\ nm}$ erreicht, und die Fermentertemperatur wurde auf 20 °C gesenkt. Die Ausbeute an feuchter Zellmasse nach der Zentrifugation betrug 9.3 kg.

Rohextrakt
2 kg der Zellen werden in 3 l 50 mM Tris-Cl-Puffer pH 8.5, 0.5 mM Mercaptoäthanol suspendiert und bei zweimaligen Durchgang durch einen Manton-Gaulin Homogenisator aufgeschlossen. Nach Zentrifugation 90 min bei 15 000 x g sind 3 l braun gefärbter Rohextrakt zu erhalten.

Streptomycinsulfat-Fällung
In die 3 l Rohextrakt werden 300 ml einer 10%igen Streptomycinsulfat-Lösung wahrend 30 min eingerührt, der Niederschlag 60 min bei 27 000 x g abzentrifugiert.

pH-Fällung
Den Überstand der Streptomycinsulfat-Fällung stellt man mit 1 n Essigsäure auf pH 4.6 ein. Der Niederschlag wird so schnell als möglich zentrifugiert (15 min bei 15 000 x g) und in ca. 3.5 l Tris-Cl-Puffer 50 mM, 1 mM DTT, pH 8 gelöst, der pH-Wert mit 10%igem Ammoniak auf 7 nachgestellt. Die Lösung wird in Portionen aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 ^{o}C aufbewahrt.

DEAE-Cellulose-Chromatographie
Man verdünnt ca. 400 ml der oben erhaltenen Lösung (Proteinkonzentration 27 mg/ml) auf eine Proteinkonzentration $\leq$ 10 mg/ml mit 50 mM Tris-Cl-Puffer, 1 mM DTT, pH 7.5 und trägt auf eine DEAE-Cellulose-Säule (6 x 20 cm, Whatman DE 32) mit 280 ml/h Geschwindigkeit auf, die zuvor mit 5 l 0.5 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.4, gefolgt von 1 l 1 mM DTT äquilibriert war. Nach Auswaschen des Durchbruches wird das Protein mit einem Kaliumphosphat-Gradienten (0.1 bis 0.5 M, pH 7.0, 1 mM DTT) eluiert, der mit einem LKB-Gradientenmischer erzeugt wird (Einstellungen: 24 h, 1 ml Mischkammer, 6 min/Fraktion, 205 ml Elutionsgeschwindigkeit). Man vereinigt jeweils etwa 15 Fraktionen, dialysiert 6 - 8 h gegen gesättigte neutralisierte Ammonsulfatlösung (inkl. 1 mM DTT) und zentrifugiert die Fällungen nach sorgfältigem Auswaschen der Dialyseschläuche ab. Die Niederschläge resuspendiert man in 3.2 M Ammonsulfat/1 mM DTT zu maximal 30 ml Volumen und zieht von diesen Suspensionen Proben von 0.5 ml, die nach Dialyse gegen 50 mM Tris-Cl, 1 mM DTT, pH 7.5 im Enzymtest eingesetzt werden.

Hydroxylapatit-Chromatographie
Aktive Fraktionen der DEAE-Chromatographie werden aus den Suspensionen abzentrifugiert und in der minimalen Menge 50 mM Tris-

Cl-Puffer pH 7.5, 1 mM DTT aufgelöst. Die Proteinmenge sollte 2.3 g nicht übersteigen. Man tragt diese Lösung auf eine Sephadex G-25-Säule (6 x 25 cm) auf und gibt den Durchbruch direkt auf eine Hydroxylapatit-Säule (6 x 15 cm, Serva p.A.) mit 105 ml/h Geschwindigkeit, die mit 5 l 0.03 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.4, 1 mM DTT äquilibriert war. Das Protein wird mit einem Kaliumphosphat-Gradienten (0.03 bis 0.35 M, pH 6.4, 1 mM DTT) mit 160 ml/h eluiert, der durch einen LKB-Gradientenmischer erzeugt wird (Einstellungen: 16 h, 1 ml Mischkammer, 7 min/Fraktion). Mit dem von der Säule eluierten Protein verfährt man wie bei der DEAE-Cellulose-Chromatographie beschrieben.

2. DEAE-Cellulose-Chromatographie (B_2-Untereinheit)
Die Untereinheit B_2 enthaltenden Ammonsulfatsuspensionen zentrifugiert man ab, löst in einer minimalen Menge 50 mM Tris-Cl-Puffer pH 7.5 und entsalzt über eine Sephadex G-25-Säule (6 x 25 cm). Der Durchbruch wird direkt auf eine DEAE-Cellulose-Säule (3.5 x 14 cm, Whatman DE 32) aufgetragen, die mit 0.05 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.4 äquilibriert war. Das Protein eluiert man mit einem linearen Kaliumphosphat-Gradienten von 0.05 bis 0.35 M, pH 6.4 mit einer Geschwindigkeit von 90 ml/h (LKB-Gradientenmischer: 16 h, 1 ml Kammer, 12 min/Fraktion). Geeignete Fraktionen werden gesammelt, gegen konzentriertes Ammonsulfat dialysiert und die Fällungen als Suspension aufbewahrt. 0.1 ml der Suspension genügen für den Enzymtest, der nach Dialyse gegen 50 mM Tris-Cl-Puffer pH 7.5 von den gesammelten Fraktionen durchgeführt werden kann.

Vorbereitung der Untereinheiten zum Enzymtest
Die aktiven Fraktionen der B_2- bzw. B_1-Untereinheit nach 2.-DEAE-Cellulose- bzw. Affinitätschromatographie werden aus der Ammonsulfatsuspension abzentrifugiert, in der minimalen Menge 40 mM HEPES-Puffer pH 7.6 aufgelöst (für B_1 inklusive 2 mM DTT) und gegen denselben Puffer 4 h dialysiert. Man teilt die Untereinheit B_1 enthaltende Lösung in 0.3 ml, die B_2-Untereinheit enthaltende Lösung in 1 ml Portionen auf und setzt 30 Volumenprozent Glyzerin p.A. zu. Die Lösungen bewahrt man bei - 18 °C auf.

4.1.2. Reinigung des Thioredoxin-Systems

4.1.2.1. Thioredoxin-Reduktase

Zellaufschluß

130 g E. coli-Zellen werden in insgesamt 400 ml Volumen in 50 mM Tris-Cl-Puffer pH 8.0, 1 mM Mercaptoäthanol suspendiert und in einem Becherglas unter Rühren und starker Kühlung in Intervallen beschallt. Die Temperatur der beschallten Lösung sollte 5 °C nicht übersteigen. Der Zellaufschluß ist durchgeführt, wenn die von der Suspension aufgenommene Ultraschallenergie abnimmt (7 bis 10 min).

Streptomycinsulfat-Fällung

Zu dem zentrifugierten Rohextrakt (90 min bei 20 000 x g) werden 8 ml/100 ml Extrakt einer 10%igen Streptomycinsulfatlösung über 30 min zugegeben und dann 30 min bei 20 000 x g zentrifugiert.

pH-Fällung

Den Überstand der Streptomycinsulfat-Fällung stellt man mit 1 N Essigsäure auf pH 4.8 ein und zentrifugiert möglichst rasch (15 min, 20 000 x g). Der Niederschlag wird in möglichst wenig 50 mM Tris-Cl-Puffer pH 8, 1 mM EDTA gelöst (pH-Wert 7.5 kontrollieren), der mit 10%igem Ammoniak neutralisierte Überstand enthält Thioredoxin.

2. Streptomycinsulfat-Fällung

Zu dem gelösten Sediment der pH-Fällung gibt man 10 ml/100 ml Lösung einer 10%igen Streptomycinsulfat-Lösung über 30 min unter Rühren zu. Der Niederschlag wird 30 min bei 20 000 x g abzentrifugiert und verworfen.

Hitzebehandlung

Den obigen Überstand hält man 5 min zwischen 60 und 65 °C, kühlt rasch ab und zentrifugiert das denaturierte Protein. Filtration durch Glaswolle entfernt letzte denaturierte Proteinreste.

Ammonsulfatfällung
Dem Überstand der Hitzebehandlung fügt man 18 g/100 ml Lösung festes Ammoniumsulfat zu, läßt eine Stunde stehen und zentrifugiert den Niederschlag. Zu dem Überstand werden weitere 45 g/100 ml Lösung festes Ammoniumsulfat gegeben und das Protein über Nacht ausgefällt. Der Niederschlag wird zentrifugiert, in wenig 50 mM Tris-Cl-Puffer, 1 mM EDTA, pH 7.5 aufgenommen und gegen denselben Puffer dialysiert.

DEAE-Cellulose-Chromatographie
Die dialysierte Lösung der Ammonsulfatfällung trägt man auf eine DEAE-Cellulose-Säule (3.5 x 12 cm, Whatman DE 32) auf, die zuvor mit 0.05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0, 1 mM EDTA äquilibriert war. Mit einem linearen Kaliumphosphat-Gradienten (0.05 bis 0.32 M, 1 mM EDTA) wird das Protein eluiert (60 ml/h) und die Fraktionen mit Thioredoxin-Reduktase-Aktivität ankonzentriert (Ultrafiltration).

ADP-Sepharose-Chromatographie
Die konzentrierten aktiven Fraktionen der DEAE-Cellulose-Chromatographie werden gegen 50 mM Tris-Cl-Puffer pH 7.5 dialysiert und auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Säule 2',5'-ADP-Sepharose (Pharmacia, 1 x 7 cm) aufgetragen (30 ml/h). Thioredoxin-Reduktase bleibt als gelbe Bande auf der Säule zurück und wird mit einem NADPH-Puls (10 ml 1 mM NADPH) von der Säule eluiert. Dialyse gegen 40 mM HEPES-Puffer pH 7.6 bzw. 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.8, 1 mM EDTA liefert die in den Enzymtests eingesetzte Thioredoxin-Reduktase.

4.1.2.2. Thioredoxin

Das Thioredoxin befindet sich im Überstand der pH-Fällung, mit dem die folgenden Reinigungsschritte durchgeführt werden:

Hitzebehandlung
Dem neutralisierten Überstand der pH-Fällung (auch der Über-

stand der Ribonucleotidreduktase-Aufarbeitung ist hier verwendbar) werden pro 100 ml Lösung 2.5 ml 0.4 M EDTA pH 8.0 zugegeben. Man erhitzt auf dem kochenden Wasserbad bis 85 °C und kühlt nach Erreichen der Temperatur rasch ab. Das denaturierte Protein wird abzentrifugiert und letzte Proteinreste durch Filtration mit Glaswolle entfernt.

Ammonsulfatfällung
Zu der Lösung der Hitzefällung gibt man 31 g Ammoniumsulfat pro 100 ml Lösung, zentrifugiert nach einstündigem Stehen und fällt das Thioredoxin durch Zugabe weiterer 30 g Ammoniumsulfat pro 100 ml Lösung. Nach Stehen über Nacht wird der Niederschlag zentrifugiert und in der minimalen Menge 50 mM Tris-Cl-Puffer pH 8.0, 1 mM EDTA aufgenommen. Die Entsalzung geschieht über eine Sephadex G 25-Säule (5 x 26 cm).

DEAE-Cellulose-Chromatographie
Eine DEAE-Cellulose-Säule (3.5 x 14 cm, Whatman DE 32) äquilibriert man zuerst mit 0.1 M dann 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0, 1 mM EDTA und trägt die entsalzten Fraktionen der Sephadex G 25 mit Thioredoxin-Aktivität auf. Der Proteindurchbruch wird ausgewaschen und das Protein mit einem linearen Gradienten 0.02 M bis 0.2 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7.0 von der Säule eluiert (70 ml/h). Die aktiven Fraktionen konzentriert man durch Gefriertrocknung und dialysiert 4 h gegen 1 mM EDTA.

4.2. Enzymtests

4.2.1. Ribonucleosidtriphosphat-Reduktase aus Lactobacillus leichmannii

Das Enzym stand mir in einer größeren Probe in reiner Form [16] zur Verfügung. Es besaß eine Aktivität von 210 µMol/h bzw. 14 µMol/h pro mg Protein = 14 Units/mg gemäß dem in der Literatur angegebenen Standardtest und Definition der Enzymaktivität.

Spektrophotometrischer Test

Die Ribonucleotidreduktion wird in einem mit thermostatisierten Küvettenhalterungen ausgerüsteten Cary 15 Spektrophotometer durch NADPH-Oxidation verfolgt. Als Wasserstoff-Überträger dient das Thioredoxin-System aus E. coli [84,18]. Um die unspezifische NADPH-Oxidation zu kontrollieren, stellt man identische Testmischungen in beide Strahlengänge und startet nach Aufnahme einer möglicherweise noch vorhandenen unspezifischen NADPH-Oxidation die Reaktion mit 4 nMolen Coenzym B_{12}. Die in 0.5 ml Volumen einer 0.5 cm Quarzküvette enthaltene Testmischung besteht aus:

Vorratslösungen	dosiertes Volumen	Testkonzentration
2 M Kaliumphosphatpuffer, 40 mM EDTA, pH 7.8	0.05 ml	0.2 M Kaliumphosphat, 4 mM EDTA
2 mM NADPH, frisch angesetzt	0.05 ml	0.2 mM
0.4 mM Desoxyadenosylcobalamin, frisch angesetzt (Im Dunkeln aufbewahren)	0.01 ml	8 µM
0.1 M (Desoxy-) Nucleosidtriphosphat	0.01 ml	2 mM
Thioredoxin, 97 µM an -SH-Gruppen, bzw. 48 µM. (ca. 50% rein)	0.04 ml	8 µM an -SH-Gruppen
Thioredoxin-Reduktase 4.5 Units/ml	0.015ml	0.15 Units/ml
Ribonucleotidreduktase 210 Units/ml, 14 Units/mg	0.01 ml	2 - 4 Units/ml
Wasser	ad 0.5 ml	

Die zeitliche Extinktionsänderung bei 340 nm wird auf der 0 - 0.1 Extinktionsskala aufgenommen und ist unter diesen Bedingungen mit der Zeit und der Enzymkonzentration linear, solange die Extinktionsänderung 0.04 Einheiten pro Minute nicht überschreitet.

Als Test auf eine sehr langsame Reduktion von br^{8}ATP werden in einem Gesamtvolumen von 0.3 ml 24 h bei 37 °C unter Lichtausschluß inkubiert:
21 Units Ribonucleotidreduktase, 0.1 µMol Desoxyadenosylcobalamin, 10 µMol Dihydroliponsäure, 2 µMol br^{8}ATP und 1 µMol dGTP in 0.03 M Dimethylglutarsäurepuffer pH 7.3. Man stoppt die Reaktion durch Aufkochen, zentrifugiert und behandelt den Überstand mit 10 µg alkalischer Phosphatase (Kälberdarm, Boehringer) bei pH 11. Nach Trennung der Nucleoside in borathaltigen Reichard's - Laufmittel läßt sich das Reaktionsgemisch mit Vergleichssubstanzen auf entstandenes Desoxyribonucleotid untersuchen.

Tritiumaustausch
Die Tritiumaustausch-Experimente von 5'-^{3}H-Desoxyadenosylcobalamin (spezifische Aktivität: 15.5 Ci/Mol) in Wasser enthalten in 0.5 ml Volumen:
0.36 Units Ribonucleotidreduktase, 25 nMol radioaktives Coenzym, 15 µMol Dihydroliponsäure und 1 µMol Nucleotid in 0.03 M Dimethylglutarsäurepuffer pH 7.3, 1 mM EDTA. Man inkubiert die Reaktionsmischung 15 min unter Lichtausschluß bei 37 °C und beendet die Reaktion durch Kühlen in flüssigem Stickstoff. Das eingefrorene Reaktionsgemisch wird mit einem in flüssigen Stickstoff gekühlten Auffanggefäß verbunden, evakuiert und das Wasser im Vakuum absublimiert. Ein Aliquot des sublimierten Wassers entnimmt man zur Radioaktivitätsbestimmung (Unisolve, Berthold bf 5000); vier Bestimmungen werden gleichzeitig durchgeführt.

4.2.2. Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase aus E. coli

Tests mit radioaktiv markiertem CDP
Die Bestimmung von Ribonucleotidreduktase-Aktivität in den Fraktionen der Säulentrennungen wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:
Man gibt 0.1 ml einer Lösung mit 4.5 µMol $MgCl_2$, 0.6 µMol DTT,

35 nMol dTTP, 42 nMol CDP und 10 µCi (5-^{3}H)CDP (19 Ci/mMol) zu 0.2 ml einer dialysierten Proteinprobe (aus den Ammonsulfatfällungen der Säulenfraktionen entnommen) und inkubiert 30 min bei 30 °C. Nach Zusatz von 1 ml 1 n $HClO_4$ wird das ausgefallene Protein abzentrifugiert und dem Überstand je 3 µMol Carrier-Nucleotide (CMP, dCMP) zugegeben. Man hält die Lösung 15 min auf dem kochenden Wasserbad, kühlt mit Eis und neutralisiert die kalte Lösung mit 4 n KOH gegen Phenolrot. Nach 30 min Stehen in der Kälte wird ausgefallenes $KClO_4$ abzentrifugiert und der Überstand im Vakuum zur Trockne eingedampft. Nach Aufnahme in 0.05 ml Wasser trennt man die Nucleotide an PEI-Cellulose-Platten (Schleicher & Schüll); die Lage und Menge von markiertem CMP und dCMP wird mit einem Berthold-Dünnschichtscanner bestimmt.

Die Mischung zur Reduktion von markiertem CDP bzw. UDP durch gereinigte Ribonucleotidreduktase enthält in 0.3 ml Volumen: 15 µg B_1, 80 µg B_2, 3.5 µMol $MgCl_2$, 3 µMol DTT, 30 nMol CDP bzw. UDP, 10 µCi (5-^{3}H)CDP bzw. (5-^{3}H)UDP (22 Ci/mMol), 0.3 µMol ATP und Analoge in 40 mM HEPES-Puffer pH 7.6. Nach Inkubation der Mischung bei 25 °C (20 min für die UDP-Reduktion) erfolgt die Aufarbeitung der Reaktionsmischungen wie oben beschrieben. Zur quantitativen Auswertung der Tests bestimmt man den Anteil der dCMP-Radioaktivität an der Gesamtradioaktivität auf den PEI-Cellulose-Platten und bezieht ihn auf die eingesetzte Menge Substrat (30.53 nMol CDP bzw. 30.455 nMol UDP).

Nachweis der Reduktion von Nucleotiden durch chromatographische Produktbestimmung

Für 24 h werden folgende Reaktionspartner bei 30 °C inkubiert: 0.115 mg B_1, 0.733 mg B_2, 8.7 µMol $MgCl_2$, 2 µMol DTT, 24 nMol dTTP, 0.75 µMol Substrat, 60 mM HEPES-Puffer pH 7.6 in 0.2 ml Gesamtvolumen. Die Reaktion wird durch Aufkochen gestoppt und die Nucleotide mit 10 µg alkalischer Phosphatase (Kälberdarm) abgebaut. Zur Konzentrierung wird gefriergetrocknet und der Rückstand in 0.05 ml Wasser aufgenommen. Entstandenes Desoxyribonucleotid ist nach Auftrennung des Reaktionsgemisches an Kieselgel-Dünnschichtplatten in Reichard's - Laufmittel sichtbar.

Spektrophotometrischer Test

Der bei 25 °C durchgeführte Test enthält in 0.15 ml Gesamtvolumen:

Vorratslösungen	dosiertes Volumen		Testkonzentration
0.6 M HEPES-Puffer pH 7.6 inkl. 0.173 M $MgCl_2$	0.01	ml	40 mM Puffer 11.5 mM $MgCl_2$
6 mM NADPH, frisch angesetzt	0.01	ml	0.4 mM
Thioredoxin: 140 µM Lösung (ca. 50% rein)	0.01	ml	9.3 µM
Thioredoxin-Reduktase 12 Units/ml	0.01	ml	0.8 Units
Substrate: 15 mM	0.005	ml	0.5 mM
1.2 mM dTTP	0.005	ml	0.04 mM
Sonstige Desoxyribonucleotide: 3 mM	0.005	ml	0.1 mM
15 mM dCTP	0.005	ml	0.5 mM
ATP, Ribonucleotide: 30 mM	0.005	ml	1.0 mM
Ribonucleotidreduktase Untereinheit B_2: 500 Units/mg 6700 Units/ml	0.015	ml	100 Units
Untereinheit B_1: 1230 Units/mg 9200 Units/ml	0.005	ml	46 Units

Man gibt die Substanzen bis auf das Substrat in eine 0.5 cm Quarzküvette und füllt mit Wasser auf 0.145 ml auf. In einem Zeiss PMQ II - Spektralphotometer mit Mikroküvetteneinrichtung wird die unspezifische NADPH-Oxidation der Mischung bei 340 nm registriert (Skala 0 - 0.2 Extinktion), bevor die Reaktion mit Substrat gestartet wird. Von der Reaktionsgeschwindigkeit ist die unspezifische NADPH-Oxidation abzuziehen.

Eine Unit Enzymaktivität ist laut Literatur als 1 nMol dTTP-aktivierte CDP-Reduktion pro 10 min definiert, die unter sättigendem Überschuß der anderen Untereinheit erzielt wird. Die angegebenen Aktivitäten der Ribonucleotidreduktase sind mit diesem Test bestimmt worden und beziehen sich auf die hier angegebene Definition der Enzymaktivität [33].

4.2.3. Aktivitätsbestimmung von Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase

Thioredoxin-Reduktase

Für den Enzymtest ist folgende Lösung frisch anzusetzen:
1 M Tris-Cl-Puffer pH 8.0, 8.75 ml; 20 mM NADPH-Lösung, 0.25 ml; 40% Dithiobisnitrobenzoesäure (DTNB) in Äthanol, 1 ml.
Von dieser Lösung gibt man 0.2 ml zusammen mit 0.3 ml Kaliumphosphatpuffer 0.33 M, 33 mM EDTA, pH 7.0 und der zu bestimmenden Lösung in eine 1 ml Küvette, füllt mit Wasser auf und registriert bei 412 nm die unspezifische Extinktionszunahme. Die Reaktion wird mit ca. 3 nMol Thioredoxin gestartet. Eine Unit Enzymaktivität entspricht der Menge Enzym, die unter diesen Bedingungen eine Extinktionsänderung von 1 hervorruft.

Thioredoxin

Für qualitative Messungen wird derselbe Test verwendet, nur daß eine bekannte Menge Thioredoxin-Reduktase vorgelegt und mit der auf Thioredoxin zu untersuchenden Lösung gestartet wird.

Der quantitative Test auf Thioredoxin enthält in 1 ml Volumen: 0.1 µMol NADPH, 0.1 Units Thioredoxin-Reduktase und 0.5 M Kaliumphosphatpuffer, 0.1 M EDTA, pH 7.0. Thioredoxin und die Reaktionspartner außer Thioredoxin-Reduktase werden in einer Quarzküvette vorgelegt, die Extinktion bei 340 nm bestimmt und nach Zugabe der Thioredoxin-Reduktase die Extinktionsänderung bis zu einem konstanten Endwert verfolgt. Die Gesamtextinktionsänderung entspricht der in der Lösung enthaltenen Thioredoxinmenge.

Der Gehalt der fraglichen Thioredoxin-Lösung an Thioredoxin ergibt sich aus diesem Test und dem Vergleich mit dem Proteingehalt der Lösung. Laut Literatur [56] bestimmt man die Proteinkonzentration: Extinktion einer Enzymprobe bei 280 nm abzüglich der Extinktion bei 310 nm multipliziert mit dem Faktor 0.9 ergibt direkt die Proteinkonzentration in mg/ml.

4.3. Phosphorylierung von Nucleosiden und Nucleotiden

4.3.1. Nucleosidmonophosphate

Die Nucleosidmonophosphate werden durch direkte Phosphorylierung der ungeschützten Nucleoside mit Pyrophosphorylchlorid [85] nach Imai et al.[60] hergestellt.
Man suspendiert 1 mMol getrocknetes Nucleosid in 30 ml m-Kresol und kühlt auf 4 °C ab. Die Reaktion wird mit 1.2 ml (8.5 mMol) Pyrophosphorylchlorid gestartet und 3 Stunden in der Kälte fortgeführt. Man stoppt die Reaktion mit Eiswasser, extrahiert m-Kresol mit Äther und neutralisiert so rasch als möglich, um die Glycosidspaltung säurelabiler Nucleotide wie PuMP zu vermeiden. Das Reaktionsgemisch wird über 10 g säuregewaschene Aktivkohle entsalzt und die Nucleotide mit Äthanol/0.2 M Ammoniak (1:1) eluiert. Nach Einengen im Vakuum trennt man Nucleoside und Nucleotide über eine Dowex 1 x 2 Formiat-Säule (1.5 x 20 cm) und eluiert nach den Nucleosiden die Nucleotide mit Ameisensäure pH 2 - 3. Im Falle des s^6PuMP erfordert die Elution 0.5 M Ammoniumformiat plus 0.2 M Ameisensäure. Das überschüssige Ammoniumformiat wird über eine Dowex 50 H^+-Säule (5 x 55 cm) entfernt. Die Ausbeuten an gefriergetrockneten Produkt (außer s^6PuMP) liegen zwischen 60 und 80%.

4.3.2. Nucleosid-di- und triphosphate

Das Nucleosidmonophosphat wird nach der Methode von Hoard und Ctt [61] mit Carbonyldiimidazol aktiviert und dann mit Mono- bzw. Pyrophosphat gekoppelt.
Tetra-(tri-n-butylammonium)-pyrophosphat
Dazu werden 1.34 g $Na_4P_2O_7$ x 10 H_2O (3 mMol) über eine Dowex 50 Pyridinium-Säule (2 x 45 cm) in die Pyridiniumform gebracht und mit 2.8 ml Tri-n-butylamin (12 mMol) versetzt. Das Wasser dampft man im Vakuum ab und trocknet durch Codestillation mit abs. Toluol und abs. Methanol. Das Salz trocknet man

weiter über Nacht im Ölpumpenvakuum.

Tri-(tri-n-butylammonium)-monophosphat
Man neutralisiert 0.35 ml ortho-Phosphorsäure (85%, 5 mMol) mit Tri-n-butylamin (3.6 ml, 15 mMol) und trocknet das Salz wie oben beschrieben.

Für die Reaktion neutralisiert man 0.5 mMol der Nucleosidmonophosphorsäure mit 1 Mol Tri-n-butylamin und trocknet über Nacht im Ölpumpenvakuum. Das Salz löst oder suspendiert man dann in 5 ml abs. Dimethylformamid (DMF) und gibt einen fünf- bis zehnfachen molaren Überschuß an Carbonyldiimidazol hinzu. Eine Reaktion und Auflösung suspendierter Nucleotide tritt sofort bei Zimmertemperatur ein und ist nach 2 Stunden beendet. Überschüssiges Carbonyldiimidazol zerstört man mit abs. Methanol und gibt dann das oben hergestellte Salz, gelöst in 10 ml abs. DMF zu. Nach 2 bis 3 Tagen bei Zimmertemperatur ist die Reaktion beendet. Das Reaktionsgemisch verdünnt man 15-fach mit Eiswasser und trägt es auf eine DEAE-Cellulose-Säule (3 x 25 cm, Whatman DE 32) in der Hydrogencarbonatform auf. Nucleosid, Mono-, Di- und Triphosphat eluiert man in dieser Reihenfolge mit einem linearen Gradienten von Tri-n-butylammoniumhydrogencarbonat von 0.05 M bis 0.5 M. Die Di- oder Triphosphat enthaltenden Fraktionen werden gepoolt und im Vakuum bei 30 ^{o}C unter Zusatz von Äthanol eingedampft. Die Ausbeuten (über 50%) werden spektroskopisch bestimmt; die Substanzen können ohne weitere Reinigung bei den Enzymtests verwendet werden. Die Reaktion gelingt auch noch bei zehnfach geringerer Menge an Nucleosidmonophosphat mit der angegebenen Ausbeute.

4.4. Darstellung von modifizierten Nucleosiden und Nucleotiden

4.4.1. 8-Bromadenosinnucleotide

Aus den unter 2.3. aufgeführten Gründen haben wir die Bromierung der Nucleosidmonophosphate nach Ikehara und Uesugi [62] und nachfolgende Phosphorylierung gewählt. Man löst 1 mMol AMP bzw. dAMP in 40 ml 1 M Natriumacetat-Puffer pH 4 und gibt 10 ml gesättigtes Bromwasser hinzu. Nach 14 h Reaktionsdauer bei Zimmertemperatur schüttelt man überschüssiges Brom mit Chloroform aus und versetzt die wässrige Phase mit Natriumhydrogensulfit bis zur Farblosigkeit. Das Reaktionsgemisch wird über Aktivkohle entsalzt (siehe Darstellung der Monophosphate,4.3.1.) und nach Konzentrierung im Vakuum auf eine Dowex 1 x 2 Formiat-Säule aufgetragen (1.5 x 20 cm). Die Trennung von nicht umgesetzten Nucleotid gelingt mit einem Ameisensäuregradienten (pH 2.6 bis pH 2.2), wobei das bromierte Produkt nach der Ausgangsverbindung von der Säule eluiert wird. Nach Gefriertrocknung und weiterem Trocknen über KOH sind 60% Ausbeute an bromiertem Nucleotid zu erhalten.

4.4.2. 2'-Desoxyxanthosin-5'-monophosphat

Man löst 250 mg Desoxyguanosinmonophosphat (0.56 mMol) in 7 ml Wasser, 0.8 ml Eisessig, 0.28 ml 2 n Salzsäure und gibt 300 mg Natriumnitrit hinzu. Bei Zimmertemperatur läßt man die Reaktion genau 4 h fortschreiten und neutralisiert dann mit KOH. Das Reaktionsgemisch wird 30-fach verdünnt und direkt auf eine DEAE-Cellulose-Säule (2.5 x 30 cm, Whatman DE 32) aufgetragen, die zuvor mit Triäthylammoniumbicarbonat äquilibriert wurde. Ein linearer Gradient von 0.05 bis 0.35 M Triäthylammoniumbicarbonat trennt dGMP von dem eine zusätzliche negative Ladung tragenden dXMP. Ausbeute: 70%. Für das Triphosphat wird wie unter 4.3.2. verfahren.

4.4.3. 2,6-Diaminopurinribosid = 2-Aminoadenosin

Man gibt 600 mg 2-Amino-6-chlorpurinribosid, gelöst in 60 ml abs. Methanol zusammen mit 20 ml trocknem flüssigen Ammoniak in einen Autoklaven und erhitzt ihn 2 Tage auf 100 °C. Die bernsteinfarbene Reaktionslösung wird eingedampft und der Rückstand über präparative Kieselgel-Dünnschichtplatten (Merck) aufgetrennt. Man entwickelt in Essigester/Äthanol/Wasser (4: 2:1); die untere Bande ist das erwünschte Produkt. Ausbeute 480 mg sauberes 2-Aminoadenosin = 77%.

4.4.4. 2-Aminopurinribosid

Die Darstellung folgt der Vorschrift von Fox et al [86].
Danach behandelt man 500 mg 6-Thioguanosin (1.6 mMole, Pharma Waldhof) mit 1 g Raney-Nickel in 40 ml Wasser 2 Stunden unter Rückfluß. Die Wasserphase wird abgenommen und das Raney-Nickel viermal mit kochendem Wasser extrahiert. Die vereinigten Wasserextrakte dampft man zur Trockne ein und trocknet über Phosphorpentoxid im Vakuum nach. Dieses Reaktionsgemisch wird direkt phosphoryliert (siehe unter 4.3.1.); während der Aufarbeitung des Phosphorylierungsgemisches über Aktivkohle erfolgt weitgehende Trennung vom Ausgangsstoff, der wesentlich fester an Aktivkohle gebunden wird. Letzte Reste der Ausgangsverbindung trennt man bei der Chromatographie an Dowex 1 x 2 Formiat (2 x 23 cm) mit einem linearen Ameisensäuregradienten von pH 2.6 bis pH 2.2. Man erhält 30 mg gefriergetrockneten Feststoff (Ausbeute 4%). Mit weniger Raney-Nickel und bei längerer Reaktionszeit sollten sich bessere Ausbeuten erzielen lassen (Literaturausbeute an Nucleosid: 50 %).

4.4.5. N^6-(p-Fluorbenzoyl-)adenosinmonophosphat

Die Darstellung des Nucleotids wurde nach Hampton und Slotin [47] durchgeführt, jedoch war nach dieser Vorschrift eine Trennung vom Ausgangsprodukt AMP nicht möglich. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches ist demnach modifiziert worden.

500 mg Adenosinmonophosphorsäure (1.4 mMol) werden in 30 ml abs. Pyridin und 0.7 ml Tri-n-butylamin weitgehend gelöst. Zu dieser Suspension gibt man 3.7 ml p-Fluorbenzoylchlorid (30 mMol). Der Feststoff löst sich auf und die Farbe der Lösung ändert sich nach rot. Nach 1.5 h wird das Reaktionsgemisch in 200 ml kaltes Wasser/Chloroform (1:1) gegossen, gemischt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase extrahiert man noch dreimal mit Chloroform und engt die Chloroform-Extrakte im Vakuum zur Trockne ein. Den Rückstand löst man in 80 ml Pyridin/Wasser (3:1) und gibt nach Kühlen auf 4 °C 50 ml 2 n NaOH zu. Man rührt 10 Minuten in der Kälte und trägt das Gemisch auf einen Dowex 50 Pyridinium-Kationentauscher (2 x 50 cm) auf, dessen Wassereluat im Vakuum zur Trockne eingedampft wird. Zu dem Rückstand gibt man 0.5 ml Tri-n-butylamin, löst ihn in der Minimalmenge abs. Methanol und fällt mit 1.5 g Natriumjodid und einem Überschuß von abs. Aceton die Nucleotide aus.

Der Niederschlag wird abzentrifugiert und in Ameisensäure (pH 3) aufgenommen. Der in Ameisensäure unlösliche Substanzrest ist in Äther löslich, und man extrahiert die wässrige Phase noch mehrfach mit Äther, um p-Fluorbenzoesäure abzutrennen. Die wässrige Phase trägt man auf eine Dowex 2 x 8 -Säule (2 x 22 cm) in der Formiatform auf und eluiert nicht umgesetztes AMP mit Ameisensäure pH 2.2. Das Produkt eluiert mit 0.5 M Ammoniumformiat/0.2M Ameisensäure von der Säule; das ankonzentrierte Eluat wird über eine Dowex 50 H^+-Säule (5 x 55 cm) von dem Ammoniumformiat befreit. Die Substanz zeigt eine hohe Affinität zum Austauscherharz. Nach der Gefriertrocknung werden 420 mg leicht bräunliche Substanz erhalten (Ausbeute 62 %).

4.5. Allgemeine Methoden und physikalische Daten der Nucleotide

Trennung von CMP (UMP) und dCMP (dUMP)
Die Trennung und quantitative Bestimmung der radioaktiven Nucleotide CMP (UMP), dCMP (dUMP) erfolgt an PEI-Cellulose-Platten (Schleicher & Schüll Nr. G 1440) in der Chloridform. Die Platten werden in 1 M LiCl gesättigt mit Borsäure / Äthanol (1:1, v/v) entwickelt (6 h) und die Radioaktivität nach dem Trocknen auf einem Dünnschichtscanner (Berthold) bestimmt. Das verwendete Gerät integrierte die dpm der Substanzflecken zur quantitativen Auswertung.

Für qualitative Zwecke kann man das Nucleotidgemisch auch an Kieselgel-Dünnschichtplatten auftrennen, indem man in dem Laufmittel: 5 M Ammoniumacetat pH 9.5, gesättigte wässrige Natriumtetraboratlösung, Äthanol (1:4:11, v/v, Reichard's-Fließmittel) entwickelt. Die Lokalisation der Radioaktivität erfolgt wie oben.

Nachweis der durch Ribonucleotidreduktase entstandenen Desoxyribonucleotide
Die Nucleosidgemische nach Inkubation mit Ribonucleotidreduktase und nachfolgend alkalischer Phosphatase werden durch Gefriertrocknung ankonzentriert und in einer minimalen Menge Wasser gelöst. Man trägt die Gemische auf Kieselgel-Dünnschichtplatten mit den entsprechenden Vergleichssubstanzen auf und entwickelt in Reichard's-Laufmittel. Die Ribonucleoside wandern als Boratkomplex langsamer als die Desoxyribonucleoside.

Chromatographie von Nucleotiden
Die Sauberkeit von Nucleotiden der drei unterschiedlichen Phosphorylierungsstufen ist durch Chromatographie an Kieselgel-Dünnschichtplatten (Riedel de Haen Nr. 37350) in dem Fließmittel Äthanol/1 M Ammoniumacetat (5:2, v/v) überprüft worden. In Tabelle 17 sind die R_f-Werte in diesem Fließmittel und die spektroskopischen Daten der synthetisierten Nucleotide zusammengestellt.

Tabelle 17 Analytische Daten der synthetisierten Nucleotide

Nucleosid	Mono- R_f	Di- R_f	Triphosphat R_f	Absorptionsmaximum bei (nm) pH 1	pH 6	pH 12	Extinktionskoeffizient x 10^3
Adenosin	0.23	0.14	0.07	257	259	259	14 pH 6
8-Bromadenosin	0.26	0.19	0.11	262	265	265	17 pH 6
8-Bromdesoxyadenosin	0.29	0.2	0.12	262	265	265	17 pH 6
Desoxyadenosin	0.25	0.16	0.08	257	259	259	14 pH 6
Arabinoadenosin	0.22	0.15	0.08	257	259	259	14 pH 6
N^6-Dimethyladenosin	0.36	0.18	0.1	267	273	273	19 pH 6
2-Aminopurinribosid	0.23	0.14	0.07	314, 245	311, 245	304, 248	6.9 pH 12
2-Aminoadenosin	0.2	0.11	0.05	253, 293	279, 255	279, 255	10 pH 6
N^6-(p-Fluorbenzoyl) -adenosin	0.3	0.21	0.14	291, 254, 260	282, 254, 260	300. 267	20.1 pH 6
6-Thiopurinribosid	0.25	0.16	0.09	322	321	309	23.1 pH 6
Purinribosid	0.3	0.17	0.09	262	262	262	7 pH 5
Benzimidazolribosid	0.33	0.24		275, 269, 262, 254	279, 272, 245		269: 6.5 pH 1
Desoxyxanthosin	0.2	0.12	0.07	260, 234	276, 247	276, 247	9.1, 10 pH 12
Desoxyguanosin	0.17			277, 255	272, 252	265	
Arabinocytidin	0.23	0.17	0.13	280	272	272	9 pH 6

5. Zusammenfassung

Die für die DNA-Synthese essentiellen Ribonucleotidreduktasen katalysieren die Reduktion der 2'-Hydroxylgruppe von Ribonucleotiden zu 2'-Desoxyribonucleotiden unter Beteiligung von Radikalzwischenstufen und werden durch die Reaktionsprodukte (Desoxyribonucleotide) in komplexer Weise alloster geregelt. Als Vertreter der Coenzym B_{12}-abhängigen und der Nicht-Häm-Eisen enthaltenden Enzyme haben wir die Triphosphatreduktase aus Lactobacillus leichmannii (EC 1.17.4.2.) und die Diphosphatreduktase aus Escherichia coli (EC 1.17.4.1.) auf ihre Spezifität gegenüber Substraten und Effektoren untersucht, da die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten sowie die scheinbar spezifischen Substrat/Effektor-Kombinationen der natürlichen Substrate bisher nicht in eine Korrelation mit deren individuellen Strukturen zu bringen war. Zu diesem Zweck sind 17 in der Base modifizierte Ribonucleotide, 6 basenmodifizierte Desoxyribonucleotide und zwei im Zucker veränderte Arabinonucleotide ausgewählt und synthetisiert worden.

Die Wechselwirkung der modifizierten sowie (zum Vergleich) der natürlichen Nucleotide mit den Enzymen wurde in einem über das Thioredoxin-System mit NADPH gekoppelten, spektrophotometrischen Enzymtest verfolgt. Ein Teil der Ergebnisse wurde auch durch Tritiumaustausch zwischen (5'-^{3}H)Desoxyadenosylcobalamin und Wasser im Fall der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase und durch Verfolgung der Ribonucleotidreduktion mit (5-^{3}H)CDP für das E. coli-Enzym bestätigt. Demnach sind Purinribosid-5'-triphosphat, N^6-Dimethyladenosin-5'-triphosphat und Benzimidazolribosid-5'-triphosphat Substrate der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit in dieser Reihe fällt. Aus der erst bei erniedrigtem pH-Wert (6.3 gegenüber 7.8) auftretenden Reduktion von Xanthosin-5'-triphosphat (pK_a = 5.7) schließen wir auf die Anwesenheit eines Glutamin- oder Asparaginsäurerestes zur Fixierung der Nucleobase im aktiven Zentrum der L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase. Der auch aus anderen Ergebnissen abgeleitete polare Aufbau der Substratbind-

ungsregion im L. leichmannii-Enzym trifft in dieser Form für die E. coli-Ribonucleotidreduktase nicht zu. Vielmehr scheinen hier hydrophobe Bindungsanteile vorhanden zu sein, was ein fallender Umsatz in der Reihe BzDP > ADP > PuDP nahelegt. Für zusätzlich vorhandene polare Wechselwirkungen zwischen Nucleobase und Protein spricht das Ausbleiben der Reduktion von Xanthosin-5'-triphosphat und eine steigende Reaktionsgeschwindigkeit in der Reihe ADP = IDP < a^2ADP < CDP < GDP < a^2PuDP, aus der wir eine Wasserstoffbrückenakzeptor-Funktion in der Gegend der 2-Position der Purinbase ableiten. In Gegenwart eines Aktivators (dTTP) erkennen wir jedoch eine zusätzliche Wasserstoffbrückendonor-Funktion in der Nähe der 6-Position der Purinbase, da jetzt IDP und GDP effektiv reduziert werden.

Wir können mit unphysiologischen Desoxyribonucleotiden (Desoxyuridin-, 5-Bromdesoxyuridin-, 8-Bromdesoxyadenosin- und Desoxyxanthosin-5'-triphosphat) belegen, daß eine Aktivierung des Substratumsatzes bei beiden Enzymen durch die Struktur der Nucleobasen von Substrat und Aktivator mitbestimmt werden. Die allostere Beeinflussung der Substratreduktion durchläuft dabei alle Abstufungen von hoher Stimulation bis zur Hemmung, was auch für die Aktivierung der Substratreduktion durch Ribonucleosid-5'-triphosphate (ATP-Analoge) der E. coli-Ribonucleotidreduktase gültig ist. Solche wechselnden dynamischen Substrat/Protein/Effektor-Beziehungen erklären wir mit einem " two-sided induced fit "-Mechanismus; die strukturellen Mindestanforderungen bei Nucleotiden und Protein (exocyclische Basensubstituenten, polare Aminosäurereste), die diese Beziehungen bestimmen müssen, lassen sich eingrenzen. Eine ausführliche Beschreibung dieser Zusammenhänge ist kürzlich von uns publiziert worden [69].

Neben der Zucker- und Basenstruktur erkennen die bakteriellen Ribonucleotidreduktasen auch die Konformation von Nucleotiden. Die Inaktivität der 8-Bromadenosin- und Formycinnucleotide als Substrate der Enzyme ist auf Grund der syn-Stellung der Nucleobase im Nucleotid, die von der vorherrschenden anti-Konformation abweicht,zu erklären. Die unterschiedlichen Effektoreigen-

schaften von br^{8}dATP und dATP sehen wir ebenfalls in einer solchen Konformationsspezifität der Enzyme begründet; ein Erkennungsmechanismus der unterschiedlichen Konformationen an den regulatorischen Zentren der Ribonucleotidreduktasen wird vorgeschlagen.

Die im Zucker modifizierten Nucleotide des Arabinoadenins und Arabinocytosins, die cytostatische und antivirale Wirkungen in vivo besitzen, sind in ihrem Einfluß auf die bakteriellen Ribonucleotidreduktasen getestet worden. Arabinocytidinnucleotide hemmen beide Enzyme kompetitiv; araCTP ist ein Aktivator der E. coli-Ribonucleotidreduktase. Das Diphosphat des Arabinoadenins hemmt E. coli-Ribonucleotidreduktase zwar kompetitiv, wirkt aber auf der Triphosphat-Stufe als starker allosterer Inhibitor beider Enzyme. Eine Hemmung der bakteriellen Ribonucleotidreduktasen durch araATP ist zur Interpretation der cytostatischen und antiviralen Wirkung dieses Nucleotids in vivo zu berücksichtigen.

6. Literaturverzeichnis

1. H. Follmann, Angew. Chem. 86, 624 (1974)
2. H.P.C. Hogenkamp, G.N. Sando, Structure and Bonding 20, 23 Springer Verlag 1974
3. G.R. Jacobsen, G.R. Stark, The Enzymes, Vol. IX, 225 (1973) Editor P.D. Boyer
4. M. Lowdon, E. Vitols, Arch. Biochem. Biophys. 158, 177 (1973)
5. W. Feller, H. Follmann, Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 752 (1976)
   W. Feller, Dissertation in Vorbereitung
6. H. Müller, R. Wahl, I. Kuntz, H. Follmann, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1299 (1973)
   H. Müller, Dissertation 1977, Marburg
7. B. Hovemann, Dissertation 1976, Marburg
8. E.C. Moore, R.B. Hurlbert, J. Biol. Chem. 241, 4802 (1966)
9. A. Larsson, Eur. J. Biochem. 11, 113 (1969)
10. S. Hopper, J. Biol. Chem. 247, 3336 (1972)
11. E. Vitols, V.A. Bauer, E.C. Stanbrough, Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 71 (1970)
12. W.A. Lewis, D.R. McNaughton, H.B. LeJohn, J.A. Wright, Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 128 (1976)
13. G. Schimpff, H. Follmann, Biochim. Biophys. Acta, im Druck
14. O. Berglund, J. Biol. Chem. 250, 7450 (1975)
15. A. Holmgren, Biochem. Soc. Transact. 5, 611 (1977)
16. D. Panagou, M.D. Orr, J.R. Dunstone, R.L. Blakley, Biochem. 11, 2378 (1972)

17. P.J. Hoffmann, R.L. Blakley,
Biochem. 14, 4804 (1975)

18. E. Vitols, C. Brownson, W. Gardiner, R.L. Blakley,
J. Biol. Chem. 242, 3035 (1967)

19. H. Follmann, H.P.C. Hogenkamp,
Biochem. 10, 186 (1971)

20. A.K. Chen, A. Bhan, S. Hopper, R. Abrams, J.S. Franzen,
Biochem. 13, 654 (1974)

21. H. Follmann, H.P.C. Hogenkamp,
Biochem. 8, 4372 (1969)

22. T.J. Batterham, R.K. Ghambeer, R.L. Blakley, C. Brownson,
Biochem. 6, 1203 (1967)

23. Y. Tamao, R.L. Blakley,
Biochem. 12, 24 (1973)

24. W.H. Orme-Johnson, H. Beinert, R.L. Blakley,
J. Biol. Chem. 249, 2338 (1974)

25. G.R. Buettner, R.E. Coffman,
Biochim. Biophys. Acta 480, 495 (1977)

26. H.P.C. Hogenkamp, R.K. Ghambeer, C. Brownson, R.L. Blakley,
E. Vitols, J. Biol. Chem. 243, 799 (1968)

27. G.N. Sando, R.L. Blakley, H.P.C. Hogenkamp, P.J. Hoffmann,
J. Biol. Chem. 250, 8774 (1975)

28. G.N. Sando, M.E. Grant, H.P.C. Hogenkamp,
Biochim. Biophys. Acta 428, 228 (1976)

29. M. Goulian, W.S. Beck,
J. Biol. Chem. 241, 4233 (1966)

30. S.S. Cohen, Progr. Nucl. Acid Res. 5, 1 (1966)

31. R.J. Suhadolnik, S.J. Finkel, B.M. Chassy,
J. Biol. Chem. 243, 3532 (1968)

32. S. Eriksson, B.M. Sjöberg, S. Hahne, O. Karlström,
J. Biol. Chem. 252, 6132 (1977)

33. N.C. Brown, Z.N. Canellakis, B. Lundin, P. Reichard,
L. Thelander, Eur. J. Biochem. 9, 561 (1969)

34. L. Thelander, J. Biol. Chem. 248, 4591 (1973)

35. A. Ehrenberg, P. Reichard,
J. Biol. Chem. 247, 3485 (1972)

36. B.M. Sjöberg, P. Reichard, A. Grälsund, A. Ehrenberg,
J. Biol. Chem. 252, 536 (1977)

37. L. Thelander, B. Larsson, J. Hobbs, F. Eckstein,
J. Biol. Chem. 251, 1398 (1976)

38. E. Vitols, H.P.C. Hogenkamp, C. Brownson, R.L. Blakley,
J. Conellan, Biochem. J. 104, 58c (1967)

39. L. Thelander, J. Biol. Chem. 249, 4858 (1974)

40. A. Larsson, P. Reichard,
J. Biol. Chem. 241, 2533, 2540 (1966)

41. N.C. Brown, P. Reichard,
J. Mol. Biol. 46, 25 (1969)

42. U. von Döbeln, P. Reichard,
J. Biol. Chem. 251, 3616 (1976)

43. N.C. Brown, P. Reichard,
J. Mol. Biol. 46, 39 (1969)

44. U. von Döbeln, F. Eckstein,
Eur. J. Biochem. 43, 215 (1974)

45. B.M. Chassy, R.J. Suhadolnik,
J. Biol. Chem. 243, 2538 (1968)

46. A.J. Murphy, M.F. Morales,
Biochem. 9, 1528 (1970)

47. A. Hampton, L.A. Slotin,
Biochem. 14, 5438 (1975)

48. A. Bloch, Ann. New York Acad. Sci. 255, 576 (1975)

49. R.J. Suhadolnik, Nucleoside Antibiotics
Wiley Interscience, New York 1970

50. W.E.G. Müller, A. Maidhof, R.K. Zahn, W.M. Shannon,
Cancer Res. 37, 2282 (1977)

51. S.A. Rashbaum, N.R. Cozzarelli,
Nature 264, 679 (1976)

52. R.Y. Chuang, L.F. Chuang,
Nature 260, 550 (1976)

53. E.C. Moore, S.S. Cohen,
J. Biol. Chem. 242, 2116 (1967)

54. S.R. Hummelhoch, E.A. Peterson,
Anal. Biochem. 17, 383 (1966)

55. M. Pries, Diplomarbeit 1976, Marburg; unveröffentlicht

56. T.C. Laurent, E.C. Moore, P. Reichard,
J. Biol. Chem. 239, 3436, 3445 (1964)

57. A. Holmgren, private Mitteilung

58. E.J. Reist, A. Benitz, L. Godman, B.R. Baker, W.W. Lee,
J. Org. Chem. 27, 3274 (1962)

59. D.G. Bartholomew, P. Dea, R.K. Robins, G.R. Revankar,
J. Org. Chem. 40, 3708 (1975)

60. K.I. Imai, S. Fujii, K. Takanohashi, Y. Furukawa, M. Honjo,
J. Org. Chem. 34, 1547 (1969)

61. D.E. Hoard, D.G. Ott,
J. Amer. Chem. Soc. 87, 1785 (1965)

62. M. Ikehara, S. Uesugi,
Chem. Pharm. Bull. 17, 348 (1969)

63. A. Levitzki, D.E. Koshland jr.,
Current Topics in Cellular Regulation 10, 1 (1976)

64. J. Monod, J. Wyman, J. Changeux,
J. Mol. Biol. 12, 88 (1965)

65. D.E. Koshland jr., G. Nemethy, D. Filmer,
Biochem. 5, 365 (1966)

66. H. Rübsamen, R. Khandker, H. Witzel,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 687 (1974)

67. G.R. Ainslie jr., J.P. Shill, K.E. Neet,
J. Biol. Chem. 247, 7088 (1972)

68. T. Uchida, F. Egami, The Enzymes, Vol. IV, 205
(1971) Editor P.D. Boyer

69. W. Ludwig, H. Follmann,
Eur. J. Biochem. 82, 393 (1978)

70. M.A. Viswamitra, M.V. Hosw, Z. Shakked, O. Kennerd,
Nature,262, 234 (1976)

71. M.A. Viswamitra, T.P. Seshadri, M.L. Post, O. Kennerd,
Nature 258, 497 (1975)

72. H. Follmann, G. Gremels,
Eur. J. Biochem. 47, 187 (1974)

73. H. Follmann, R. Pfeil, H. Witzel,
Eur. J. Biochem. 77, 451 (1977)

74. O. Röder, H.D. Lüdemann, E. v.Goldammer,
Eur. J. Biochem. 53, 517 (1975)

75. D.L. Sloan, L.A. Loeb, A.S. Mildvan, R.J. Feldmann,
J. Biol. Chem. 250, 8913 (1975)

76. E. Westhof, O. Röder, I. Croneiss, H.D. Lüdemann,
Z. Naturf. 30c,131 (1975)

77. H.D. Lüdemann, E. Westhof,
Z. Naturf. 32c,528 (1977)

78. R.H. Sarma, C.H. Lee, F.E. Evans, N. Yashindra,
M. Sundaralingam, J. Am. Chem. Soc. 96, 7337 (1974)

79. H. Follmann, Common principles in substrate and conformation specificity of nucleotide-converting enzymes.
NMR in Molecular Biology, Jerusalem 1978, B. Pullman (Herausgeber), im Druck

80. D.B. Davies, S.S. Danyluk,
Biochem. 13, 4417 (1974)

81. J.G. Cory, M.M. Mansell,
Cancer Res. 35, 2327 (1975)

82. D.M. Peterson, E.C. Moore,
Biochim. Biophys. Acta 432, 80 (1976)

83. M. Remin, E. Darzynkiewicz, I. Ekiel, D. Shugar, Biochim. Biophys. Acta 435, 405 (1976)

84. W.S. Beck, M. Goulian, A. Larsson, P. Reichard, J. Biol. Chem. 241, 2177 (1966)

85. H. Grunze, Z. Anorg. Allg. Chem. 324, 1 (1963)

86. J.J. Fox, I. Wempen, A. Hampton, I.L. Doerr, J. Amer. Chem. Soc, 80, 1669 (1958)

Mein besonderer Dank gilt

Prof.Dr.H.P.C.Hogenkamp und Prof.Dr.R.L.Blakley für die großzügige Überlassung von L. leichmannii-Ribonucleotidreduktase und radioaktivem Coenzym B_{12}.

Frl.G.Schimpff für die sachkundige Hilfe bei der Präparation von E. coli-Ribonucleotidreduktase.

meinem Doktorvater Prof.Dr.H.Follmann, der die technischen Voraussetzungen dieser Arbeit durch seinen persönlichen Einsatz ermöglichte und für die volle Reifung mancher Gedanken sorgte.

Lebenslauf

13. Dezember 1950	Geburt als Sohn des Heinrich Ludwig und seiner Frau Anna in Kassel.
Ostern 1957	Einschulung in die Bürgerschule " Gräfestraße " in Kassel.
Ostern 1961	Wechsel zum humanistischen Friedrichsgymnasium in Kassel.
Juni 1969	Abitur am Friedrichsgymnasium.
Oktober 1969	Aufnahme des Chemie-Studiums an der Technischen Universität Clausthal in Clausthal-Zellerfeld.
7. Februar 1972	Chemie-Vorexamen.
April 1972	Universitätswechsel an die Philipps-Universität in Marburg/Lahn.
30. Mai 1974	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung.
WS 1974 - SS 1975	Anfertigung der Diplomarbeit im Fachgebiet Biochemie.
31. Juli 1975	Abschluß als Diplom-Chemiker.
Oktober 1975 - Dezember 1977	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Follmann am Fachbereich Chemie, Abteilung Biochemie.
Seit August 1975	Verheiratet mit Ruth Neumann.